

Implantatiekansen van embryo's na in-vitro-fertilisatie

Klinische en genetische aspecten

Implantatiekansen van embryo's na in-vitro-fertilisatie

Klinische en genetische aspecten

**IMPLANTATION RATES PER EMBRYO FOLLOWING
IN-VITRO-FERTILIZATION
CLINICAL AND GENETICAL ASPECTS**

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR AAN DE
ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS**

PROF.DR P.W.C. AKKERMANS M.A.

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VOOR PROMOTIES.

**DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 9 DECEMBER 1998 OM 9.45 UUR**

DOOR

MICHAEL CORNELIS WILHELMUS SCHOLTES

GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE

PROMOTIECOMMISSIE

PROMOTOR: PROF. DR G.H. ZEILMAKER

OVERIGE LEDEN: PROF. DR M. DHONT

 PROF. DR B.C.J.M. FAUSER

 PROF. DR M.F. NIERMEYER

COPROMOTOR: DR A. VERHOEFF

A major key to progress is to forget what we think we know about cellular growth requirements and instead to ask the cells we are studying to tell us at every step exactly what conditions they consider to be optimal. The cells know far better than we do what their actual requirements are, and to the extent that we impose our wills on them instead of listening to their needs, they will resist our efforts.

R.G. Ham, 1982.

*Opgedragen ter
nagedachtenis
aan mijn ouders
en aan Annette
Cees
Thomas
Sophia
Quinten
Charlotte.*

INHOUD	7
INLEIDING	12
Ontwikkeling van de voortplantingsgeneeskunde	12
Doelstellingen voor dit onderzoek	13
Referenties	15
HOOFDSTUK I	16
Historische ontwikkeling van embryoplaatsing (transfer)	16
Ontwikkelingen tot de twintigste eeuw	16
Verdere ontwikkeling van de moderne voortplantingsbiologie en celkweek	17
Klinische toepassing van de voortplantingsgeneeskunde	18
Het tijdperk van micro-injectie van de eicel	20
Referenties	21
HOOFDSTUK II	24
De plaatsing van gameten, zygoten en embryo's in de eileider	
Deel 1	24
<i>Inleiding tubaire embryoplaatsingstechnieken</i>	
Laparoscopische technieken	25
- Gamete Intra Fallopian Transfer (GIFT)	25
- Zygote Intra Fallopian Transfer (ZIFT)	27
Transcervicale plaatsingstechnieken	29
Deel 2	31
<i>Pilotstudie over de plaatsing van zygoten via de cervix uteri in de eileider:</i>	
<i>Transcervical Intra Fallopian Transfer (TIFT) van zygoten</i>	
<i>(naar Fertil Steril 1990;54:283-286.)</i>	
Samenvatting	31
Inleiding	31
Materiaal en methoden	32

Resultaten	33
Discussie	35
 Deel 3	 37
<i>Een gerandomiseerde studie over transcervicale intratubaire plaatsing van zygoten onder echoscopische controle versus intra-uteriene plaatsing van 4-8 cellige embryo's (naar Fertil Steril 1994;61:102-4.)</i>	
Samenvatting	37
Inleiding	37
Materiaal en methoden	38
Resultaten	40
Discussie	40
Samenvatting en conclusies	42
Referenties	45
 HOOFDSTUK III	 53
IVF en de intra-uteriene plaatsing van blastocysten	
Deel 1	53
Inleiding	53
Embryonale preïmplantatie-ontwikkeling	53
Bevruchting	53
Precompactiefase 24-84 uur na inseminatie	54
Compactie tot implantatie; Morula tot "hatching" blastocyst	55
Groeivertraging en ontwikkelingsstop	56
Fysiologische aspecten van preïmplantatie-embryo's	57
Mediumsamenstelling	58
Co-cultuur ter ondersteuning van de IVF-kweek	58
Conclusies	60
Appendix	62
 Deel 2	 64
<i>Een prospectief gerandomiseerde studie over plaatsing van embryo's na IVF bij een kweekduur van drie of vijf dagen (Fertil Steril 1996;65:1245-8.)</i>	

Samenvatting64
Inleiding65
Materiaal en methoden66
Resultaten68
Discussie70
 Deel 372
<i>De kans op plaatsing in utero van blastocysten na een kweekduur van vijf dagen wordt bepaald door het aantal gepuncteerde eicellen en niet primair door de leeftijd van de vrouw (Fertil Steril 1998;69:78-83.)</i>	
Samenvatting72
Inleiding73
Materiaal en methoden73
Resultaten75
Discussie76
Referenties82
 HOOFDSTUK IV91
Genetische aspecten van infertiliteit bij de man	
Deel 191
Inleiding91
Embryologie94
Genetische aspecten van de mannelijke geslachtsdeterminatie en differentiatie94
Genetische regulering95
Genetische aspecten van infertiliteit bij de man96
Populatie studies van IVF- en ICSI-patiënten97
Frequent voorkomende afwijkende karyotypen bij ICSI-patiënten: genetisch advies99
Overwegingen bij genetisch advies bij geslachtschromosomale mozaïeken99
 Deel 2106
<i>Chromosomale afwijkingen bij ICSI-patiënten: invloed op implantatie en doorgaande zwangerschappen (naar Fertil Steril 1998, ter perse)</i>	

Samenvatting	106
Inleiding	107
Materiaal en methoden	107
Resultaten	108
Discussie	114
Referenties	116

HOOFDSTUK V

ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen

Deel 1

Inleiding	123
Chirurgische methoden om zaadcellen te verkrijgen	124
Het prepareren van zaadcellen uit testismateriaal	125
Complicaties bij het winnen van epididymale en testiculaire zaadcellen	127
Indicatiestelling voor ICSI met chirurgisch verkregen zaad	129
Literatuuroverzicht resultaten van de ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen	130

Deel 2

ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen:

Ervaringen van het IVF-Centrum Düsseldorf

Inleiding	136
Vooronderzoek van de patiëntenpopulatie en stimulatieprotocollen	137
Gemodificeerde werkwijze TESE, IVF-Centrum Düsseldorf	138
ICSI met TESE uit gecryopreserveerd testisweefsel of gecryopreserveerde epididymale zaadcellen: resultaten en klinische aspecten	141
IVF-ICSI met gecryopreserveerd testisweefsel na enzymatische zaadcelextactie: regionale patiënten populatie	141
IVF-ICSI bij transport-TESE en -MESA	143
Resultaten	144
Discussie	151
Veiligheidsaspecten van ICSI met gebruikmaking van chirurgisch verkregen zaadcellen: overwegingen in samenhang met het Gezondheidsraadrapport over ICSI	156

Referenties	159
Samenvatting	170
Summary	173
Verklarende woordenlijst	175
Dankwoord	177
Curriculum vitae	179

INLEIDING

Ontwikkeling van de voortplantingsgeneeskunde

In de laatste 40-50 jaar heeft zich uit de gynaecologie, andrologie, endocrinologie, fysiologie en diergeneeskunde een geheel nieuw (sub)specialisme ontwikkeld, de voortplantingsgeneeskunde.

Mede door nieuwe technische mogelijkheden groeide het in korte tijd uit tot een volwaardige tak van de gynaecologie.

Intensieve endocrinologische research van de menstruele cyclus leidde tot orale anticonceptie (1), isolatie en zuivering van humaan menopausaal gonadotrofine (hMG) (2) en van humaan chorio-gonadotrofine (hCG), hormonen van cruciaal belang voor de huidige voortplantingsgeneeskunde.

Echoscopisch onderzoek (3), vooral met vaginale transducers (4), maakte ruimere toepassing mogelijk van hormonale inductie en het vervolgen van het resultaat door echoscopische cyclusanalyse.

Snelle en betrouwbare oestradiol-, luteïniserend- hormoon (LH)- en hCG-bepalingen verbeterden de diagnostiek en interventies in de fertiliteitsbehandeling.

De gonadotroop-releasing-hormoon analoga (GnRH-ana) (5), zorgden voor een nieuwe doorbraak die ook te verwachten is als de GnRH-antagonisten, die momenteel in fase III onderzoek zijn, beschikbaar komen.

Een nieuwe fase in de hormoontherapie werd mogelijk gemaakt met hormonen, gemaakt via recombinant DNA technieken. Deze hormonen, zoals recombinant follikelstimulerend hormoon (rec-FSH) (6) en recombinant-LH zullen nog verder worden ontwikkeld. Belangrijke aspecten zijn biologische veiligheid, zuiverheid, consistentie en de onbeperkte productiecapaciteit.

De gynaecologische reproductieve chirurgie kreeg als nieuwe aanwinsten de laparoscopie (7) en de microchirurgie (8) als weefselsparende chirurgie. De laparoscopie bood nieuwe diagnostische mogelijkheden bij tubopathologie en endometriose en opende de weg naar endoscopische chirurgie.

De gynaecologische microchirurgie heeft een beperkt maar belangrijk indikatiegebied bij refertilisatie van de tuba en in mindere mate van het vas deferens.

De geboorte van het eerste kind na in-vitro-fertilisatie (IVF) (9) in 1978 leidde tot een

snelle groei van de IVF in de tachtiger en negentiger jaren: voor tubapathologie en andere vormen van infertiliteit bij de vrouw ontstonden nieuwe opties.

De betekenis van IVF werd verruimd door toevoeging van de intra-cytoplasmatische sperma-injectie (ICSI) (10), eerst als oplossing voor de infertiliteit bij de man later ook tot onbegrepen uitblijven van bevruchting bij IVF.

Bij ICSI werd het zaad verkregen via micro-epididymale-sperma-aspiratie (MESA) (11) of testiculaire sperma extractie (TESE) (12), waarmee sommige mannelijke infertiliteitsoorzaken konden worden opgeheven.

Doelstellingen voor dit onderzoek

Dit proefschrift beschrijft waarnemingen uit een periode van 10 jaar de implantatiekans van embryo's bij de klassieke IVF en variaties daarvan, waarbij embryo's in het 4-8 cellig stadium of als blastocysten intra-uterien worden geplaatst of als zygoten transcervicaal in de eileider.

De plaatsing van zygoten in de eileider, Transcervical Intra Fallopian Transfer (TIFT) genoemd, gebeurde met een catheter via de cervix uteri in de eileider. Dit onderzoek werd verricht in het Dijkzigt ziekenhuis. De andere studies werden uitgevoerd in het IVF centrum Düsseldorf.

De plaatsing van blastocysten was bedoeld om na te gaan of een hoog zwangerschapspercentage bereikt zou kunnen worden door plaatsing van 2 blastocysten in de uterus en of het risico op het ontstaan van drielingen verregaande zou kunnen worden vermeden.

De implantatiekans van embryo's na ICSI bij wensouders met een cytogenetische afwijking werd bepaald evenals van embryo's na bevruchting van eicellen met chirurgisch verkregen zaadcellen. Bij testiculaire zaadcellen werden deze enzymatisch uit vooraf in vloeibare stikstof ingevroren testisbiopten geïsoleerd. De invloed van langdurig transport van testis weefsel vóór invriezen werd geëvalueerd.

Er wordt ingegaan op de chromosoomonderzoek van de behandelde paren en de mogelijke consequenties van gevonden chromosoomafwijkingen. De bevruchtungskans, implantatie en eventuele zwangerschap bij chromosoomafwijkingen van de behandelde paren worden besproken.

De maatschappij heeft dringend behoefte aan "Evidence Based Medicine", zeker als het gaat om onzekere genetische risico's voor patiënten waarbij ICSI wordt uitgevoerd met chirurgisch

verkrege n zaadcellen. Ter volledigheid dient vermeld te worden dat de in dit proefschrift beschreven behandelingen met chirurgisch verkrege n zaadcellen in Duitsland uitgevoerd werden, daar momenteel in Nederland een moratorium van kracht is ten aanzien van het gebruik van chirurgisch verkrege n sperma voor ICSI-behandeling (zie hoofdstuk V).

Referenties

1. Pincus G, Rock J, Garcia CR, Rice-Wray E, Paniagua M, Rodriguez J. Fertility control with oral medication. *Am J Obstet Gyn* 1958;75:1333.
2. Gemzell CA, Diczfalusy E, Tilliger KG. Clinical effect of human pituitary follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958;18:1333.
3. Kratochwil A, Urban G, Friedrich F. Ultrasonic tomography of the ovaries. *Ann Chir Gynaec Fenn* 1972;61:211.
4. Meldrum D, Chetkowski RJ, Steingold KA, Randle D. Transvaginal ultrasound scanning of ovarian follicles. *Fertil Steril* 1984;42:803-5.
5. Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using buserelin and gonadotropins. *Lancet* 1984;2,1284-5.
6. Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJW, Boime I. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1989;264:4769-75.
7. Semm K. Die Laparoscopie in der Gynäkologie. *Geburtsh Frauenheilk* 1967;27: 1029-42.
8. Swolin K. Experimentelle Studien zur Prophylaxe von intraabdominalen Verwachsungen. Versuche an der Ratte mit einer Emulsion aus Lipid und Prednisolon. *Acta-Obstet-Gynecol-Scand* 1966;45:473-98.
9. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2:366.
10. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
11. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994; 61:1045-51.
12. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62:639-41.

HOOFDSTUK I

Historische ontwikkeling van embryoplaatsing (transfer)

Embryoplaatsing fascineerde de mensheid reeds in de oudheid. In 559 voor Chr. zou volgens een Indiase legende in Rajastan een embryo uit de uterus van de vrouw van een priester, Devananda genaamd, getransplanteerd zijn in de uterus van koningin Trisala. De daaruit geboren zoon werd de stichter van de Jain religie.

Ontwikkelingen tot de twintigste eeuw

Aan het eind van de negentiende eeuw werden de eerste embryotransfers verricht van een konijnenembryo door William Heape (1). Het doel was de effecten te bestuderen van het uteriene milieu van een draagmoeder(!) op embryo's (geïsoleerd uit een ander konijn) en om na te gaan of deze donor embryo's invloed zouden hebben op de eigen nakomelingen. Embryo's werden 32 uur na het dekken van het donorkonijn verwijderd en 3 uur na het dekken van de draagmoeder ingebracht in de eileider.

Uit dit en ander werk van Heape zoals "The sexual season of mammals and the relation of the pro-oestrus to menstruation" (2) onstond de industriële veeteelt.

Kunstmatige inseminaties kregen eerst belangstelling vanuit economisch oogpunt.

Arabieren zouden reeds veel vroeger de techniek hebben toegepast (3). In 1784 beschreef Spallanzani (4) een succesvolle kunstmatige inseminatie van een spaniel, een eeuw nadat door Antoni van Leeuwenhoek de zaadcel ontdekt werd.

Er lag een lange weg tussen ontdekken en beschrijven van de anatomie en de juiste vertaling in de fysiologie.

Reinier de Graaf beschreef naast blastocysten in tuba en uterus ook corpora lutea in "de mulierum organis inservientibus tractatus novus" (1672). Hij veronderstelde dat follikels het menselijke ei waren, naar analogie van het kippenei. Bij het koken van menselijke ovaria stelde de follikelvloeistof tot hetzelfde aspect als het "albumen", het eiwit van een kippenei.

De functie van het ovarium was nog onduidelijk. Zo had men een experiment van Nuck in 1691 (5) vergeten. Het afbinden van één uterushoorn van een teefje na de copulatie leidt ertoe dat embryo's alleen in de andere uterushoorn ontstaan.

Karl Ernst von Baer (6) deed in Estland (1827) de eerste microscopische observatie van het ei bij de hond. De penetratie van een zaadcel in een eicel werd in 1843 door Barry (7) vastgelegd. Schwann gaf in 1839 een eerste basis voor de moderne embryologie met theorieën over bevruchting en embryonale ontwikkeling (8).

Levende eicellen in de tuba bij dieren werden waargenomen bij het schaap (Hausmann 1840, 9), hond (Bischoff 1845, 10) en bij de mens in 1928 (Allen et al., 11).

Het bevruchtingsproces met de daaropvolgende klievingsdelingen werd al in 1853 door Newport (12) bij amfibieën geobserveerd en in 1875 bij zoogdieren door Hertwig (13).

Verdere ontwikkeling van de moderne voortplantingsbiologie en cellweek

De basis van anatomie en fysiologie leidden tot inzicht in de reproductieve endocrinologie en -biologie.

Economische motieven waren de eerste stimulans om de reproductieve biologie te ontwikkelen.

Er ontstond research naar het uteriene milieu (14), de kwaliteit van embryo's (15) en synchronisatie (16) van donor en acceptor. Muizenexperimenten met embryotransfer vonden plaats bij kankeronderzoek (17) en in de genetica (18).

In 1927 werd de hypofyse-ovarium as aangetoond door Smith en Engel (19), Zondek en Aschheim (20) en kon superovulatie bij muizen worden geïnduceerd (21).

Reeds in 1929 werden door Pincus (22) superovulatie van donorkonijnen, transplantatie van bevruchte eicellen en in-vitro cultuur uitgevoerd, echter nog zonder veel succes.

De volgende twee decennia brachten succesvolle experimenten met hypofysaire en urinaire gonadotrofine-extracten voor superovulatie in huisdieren, koeien en schapen.

Cambridge was het belangrijkste centrum voor onderzoek over het isoleren van embryo's en transplantatie naar een acceptor-uterus.

Pincus en Umbaugh (23) deden embryo-experimenten bij de koe. In Cambridge werd ook transport van donorsperma in 1926 (24) beproefd, later (1961) van levende (25) en gecryo-conserveerde embryo's (1978; 26).

Experimenten over intra-uteriene plaatsing van donorembryo's bij muizen, ratten en konijnen (27,28,29,30,31) gingen vooraf aan toepassing bij de mens. De nauwe samenhang van de implantatiekansen met de ontwikkelingsfase van het embryo en van het endometrium bleek uit

het proefdieronderzoek. Overplanting van een rattenembryo naar de tuba was minder riskant voor de ontwikkelingskansen dan transfer naar de uterus. Bij de mens worden daarentegen tegenwoordig embryo's doorgaans in het 4-8 cellig stadium intra-uterien geplaatst. Een betere kans op implantatie van intra-uterien geplaatste blastocysten zou dus ook kunnen berusten op een betere synchronisatie tussen het ontwikkelingsstadium van het embryo en de uitrijping van het endometrium in de uterus.

In latere experimenten betreffende intra-uteriene plaatsing van muizen- en rattenzygoten werd bevestigd dat de tuba een gunstiger ontwikkelingsmilieu biedt voor zygoten (32). Er vond zelfs ontwikkeling plaats als zygoten bij prepuberale acceptormuizen werden geplaatst. Voor een normale vroege ontwikkeling van konijnenembryo's (33) was de aanwezigheid van progesteron noodzakelijk.

Uit economisch belang werden ook door Rowson bij koeien (34) en Wilmot bij schapen (35) studies gedaan met transplantatie van donorembryo's waarbij respectievelijk een synchronisatie tussen donor en acceptor van $\pm 1 - 2$ dagen voor een acceptabele implantatie vereist was. Uit de bovenstaande studies blijkt het belang van synchronisatie en de wezenlijke verschillen tussen diersoorten ten aanzien van groeisnelheid van embryo's en de eisen die vanuit het embryo aan de omgeving worden gesteld. In dit licht lijkt het implantatievenster bij de mens, dwz. de tijdspanne waarin plaatsing van gameten/zygoten/embryo's tot implantatie kan leiden, nogal ruim.

Na het embryowerk bij proefdieren en in de veeteelt culmineerde deze techniek in 1978 (36) in de geboorte van het eerste in-vitro-fertilisatie kind, ook weer in Cambridge.

Een belangrijk aspect voor het slagen van in vitro kweken was de samenstelling van de media (37) en het beheersen van de kweekomstandigheden, zoals temperatuur, vochtigheidsgraad, CO₂ en steriliteit.

Klinische toepassing van de voortplantingsgeneeskunde

Methoden van embryoplaatsing bij proefdieren en toepassingen in de veeteelt worden later toegepast in de humane voortplantingsgeneeskunde zoals chirurgische tubaire embryoplaatsingen.

In grote lijnen ontwikkelde zich rond het centrale thema reageerbuisbevruchting een aantal

variaties in de uitwerking en toepassing van deze techniek. De duur van de embryokweek was een belangrijke factor. De kweekomstandigheden en kweekmedia varieerden per laboratorium. Langer kweken werd en wordt als nadelig beschouwd voor de embryonale ontwikkeling. Intra-uteriene embryoplaatsing werd gedaan na 1, 2, 3, 4, 5 en soms 6 dagen, respectievelijk in het zygotestadium, als 4-cellig, 8-cellig embryo, morula, blastocyste/expanderende blastocyste. Anderzijds is het aantal embryo's dat per behandeling geplaatst wordt geplaatst een blijvend punt van discussie. In het buitenland is de plaatsing van 4 embryo's of meer per IVF-behandeling niet ongebruikelijk. Het is echter verontrustend dat bv. in de USA, ondanks de grote kans op meerlingszwangerschappen, plaatsing van meer dan drie embryo's voordoort. Het "Practice Committee Report, Guidelines on number of embryo's transferred" van de American Society for Reproductive Medicine (ASRM) adviseert in 1998 op basis van "Evidence Based Medicine" om "niet meer dan 3-5 embryo's te plaatsen". De huidige standaard in Nederland en de meeste West Europese landen is dat twee, maximaal drie embryo's ingebracht kunnen worden.

De IVF techniek vereist naast ovulatieinductie en eicelaspiratie ook laboratoriumfaciliteiten (en expertise) voor reageerbuisbevruchting. Minder "manipulatie" en techniek vraagt de techniek van de Gamete Intra Fallopian Transfer (GIFT) (38). Daarbij worden onbevuchte ei- en zaadcellen in de tuba ingebracht. Tevens kon deze variant van de IVF-methode waarbij geen bevruchting in-vitro werd uitgevoerd, een aantal religieuze bezwaren uit de weg ruimen.

Een transvaginale methode om gameten in de eileider te plaatsen was toen nog niet beschikbaar.

Een Zygote Intra Fallopian Transfer (ZIFT) (39) is iets gecompliceerder. Daarbij worden een dag na de eicelpunctie bevruchte eicellen in het pronucleusstadium (PN) per laparoscopie ingebracht in de tuba. Het hoge succespercentage van ZIFT stimuleerde om een transvaginale transcervicale tubacatheterisatie als overdrachtsmethode te beproeven, waarvoor destijds een pilot project werd gestart. Per behandelingscyclus werden embryo's in het 2 PN stadium transcervicaal in de tuba geplaatst. In de IVF groep van het academisch ziekenhuis Dijkzigt werd dit TIFT (Transcervicale Intra Fallopian Transfer) genoemd, analoog aan GIFT en ZIFT. Minder wijd verbreide technieken waren het direct inbrengen van zaad en eicellen in het cavum uteri, TOAST (Transcervical Oocyte And Sperm Transfer) (40), recentelijk de DIPI (Direct Intra Peritoneal Insemination) (41) en FSP (Fallopian Sperm Perfusion) (42). Laatstgenoemde methoden zijn alternatieven voor de intra-uteriene inseminatie. Uiteindelijk

heeft zich toch de transcervicale plaatsing van embryo's in de uterus als meest praktische methode weten te handhaven.

Het tijdperk van micro-injectie van de eicel

Terwijl de kans op embryoplaatsing bij IVF op indicatie van onvruchtbaarheid bij de man enkele jaren geleden nog gering was, is sinds de invoering van micro-injectie van een zaadcel in de menselijke eicel daarin een grote ommezwaai ontstaan. Aanvankelijk werden een aantal zaadcellen onder de Zona Pellucida gebracht, de Sub Zonal Sperm Injection (SUZI) (43), met bescheiden resultaten. Daarna kwam met overweldigend succes de ICSI (44), gevolgd door verdere uitbreiding van de indicatiestelling door het gebruik van chirurgisch verkregen zaad (MESA; 45, TESE; 46).

Een blik in de toekomst doet vermoeden dat de IVF-ET in enkele richtingen nog verder zal ontwikkelen. Ten eerste zal gestreefd worden naar een nog betere geïndividualiseerde stimulatiecyclus met hormonen, die grotendeels via DNA-recombinatietechnologische procedures gemaakt worden. Tegelijkertijd zal de in-vitro rijping van oöcyten en zaadcellen en cryopreservatie (47) van ovariumweefsel door kweektechnieken met gebruikmaking van hormonen, een nieuwe dimensie toevoegen. De preïmplantatie diagnostiek (48), het vaststellen van chromosomale en DNA afwijkingen in het embryo en de daaraan verbonden observatie van het embryo bieden de mogelijkheid tot het selecteren van embryo's. Terughoudendheid bij het aantal geplaatste embryo's kan het ontstaan van grote meerlingzwangerschappen voorkomen.

Referenties

1. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc* 1890;48:457-8.
2. Heape W. The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Q J microsc Sci* 1900;44:1-70.
3. Heape W. The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilization or impregnation of their ova. *Proc R Soc* 1897;61:52-63.
4. Marshall FHA. *The Physiology of Reproduction*. 1st ed. Longmans and Green and Co. London, 1910:181-2.
5. Nuck A. *Adenographia curiosa et uteri foeminei anatome nova cum epistola ad amicum de inventis novis*. Leiden, 1691.
6. Bear von KE. *De ovi mammalium et hominis genesi*. Leipzig, 1827.
7. Barry M. Spermatozoa observed within the mammiferous ovum. *Phil Trans R Soc* 1843:133;33.
8. Sarton G. The discovery of the mammalian egg and the foundation of modern embryology. *Isis* 1931;16:315-78.
9. Hausmann. *Über die Zeugung und Entstehung des wahren weiblichen Eies*. Hannover, 1840.
10. Bischoff TLW. *Entwicklungsgeschichte des Hundeeies*. Braunschweig, 1845.
11. Allen E, Pratt JP, Newell QU, Bland L. Recovery of human ova from the uterine tubes: time of ovulation in the menstrual cycle. *J Am med Ass* 1928;91:1018-20.
12. Short RV. The discovery of the ovaries. In: Zuckermann S, Weir BJ, editors. *The Ovary*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1977;1:1-39.
13. Corner GW. The discovery of the mammalian ovum. In: Saunders WB, editor. *Lectures on the History of Medicine*(Mayo Fdn). Philadelphia, 1933:401-26.
14. Warwick BL, Berry RO, Horlacher WR. Results of mating rams to Angora female goats. *Proceedings of the 27th Ann Meet Am Soc Anim Prod*, 1934:225-7.
15. Casida LE, Warwick EJ, Meyer RK. Survival of multiple pregnancies induced in the ewe following treatment with pituitary gonadotropins. *J Anim Sci* 1944;3:22-8.
16. Nicholas JS. Development of transplanted rat eggs. *Proc Soc exp Biol Med* 1933;30:1111-3
17. Fekete E, Little CC. Observations on the mammary tumor incidence in mice born from transferred ova. *Cancer Res* 1942;2:525-30.

18. Beatty RA. Transplantation of mouse eggs. *Nature*, London 1951;168:995.
19. Smith PE, Engle ET. Experimental evidence reporting the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *Am J Anat* 1927;40:159-217.
20. Zondek B, Aschheim S. Das Hormon des Hypophysenvorderlappens. *Klin Wschr* 1927; 6:248-52.
21. Engle ET. Pregnancy following superovulation in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1927;25:84-5.
22. Pincus G. Observations on the living eggs of the rabbit. *Proc R-Soc Lond B Biol Sci* 1930; 107:132-67.
23. Chang MC. Experimental studies of mammalian spermatozoa and eggs. *Biol Reprod* 1971;4:3-15.
24. Walton A. Preservation of mammalian spermatozoa. *Nature*, London 1926;118:265.
25. Adams CE, Rowson LEA, Hunter GL, Bishop GP. Long distance transport of sheep ova. *Proceedings of the 4th Int Congr Anim Reprod & A I*, The Hague. 1961;2:381-2.
26. Willadsen SM, Tischner M. Successful long-distance transport by car of sheep embryos stored in liquid nitrogen. *Bull Acad pol Sci Cl II Ser Sci Biol* 1978;26:725-6.
27. Noyes RW, Dickmann Z. Survival of ova transferred into the oviduct of the rat. *Fertil Steril* 1961;12:67-79.
28. Noyes RW, Dickmann Z. Relationship of ovular age to endometrial development. *J Reprod Fertil* 1960;1:186-96.
29. Noyes RW, Doyle LL, Gates AH, Bentley DL. Ovular maturation and fetal development. *Fertil Steril* 1961;12:405-16.
30. Dickmann Z, Noyes RW. The fate of ova transferred into the uterus of the rat. *J Reprod Fertil* 1960;1:197-212.
31. Doyle LL, Gates AH, Noyes RW. Asynchronous transfer of mouse ova. *Fertil Steril* 1963; 14:215-25.
32. Beyer G, Zeilmaker GH. Development of mouse and rat zygotes following transfer to non-synchronized rat and mouse oviducts. *J Reprod Fertil* 1973;33:141-3.
33. Adams CE. The development of rabbit eggs in the ligated oviduct and their viability after re-transfer to recipient rabbits. *J Embryol Exp Morphol* 1973;29:133-44.
34. Rowson LEA, Lawson RAS, Moor RM, Baker AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J Reprod Fertil* 1972;28:427-31.

35. Wilmut I, Sales DL. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J Reprod Fertil* 1981;61:179-84.
36. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
37. Zeilmaker GH. Cryopreservation and related IVF activities. In: Alberda A, Gan RA, Vemer HM editors. *Pioneers in IVF*. London U.K.: Parthenon Publishing Group, 1995;81-9.
38. Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR, Wong PC. Gamete intra-fallopian transfer (GIFT): a new treatment for infertility. *Int J Fertil*. 1985;30: 41-5.
39. Devroey P, Braeckmans P, Smits J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem A, Heytens L, Camu F. Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1986;1:1329.
40. Veersema S, Bernardus RE, Veersema D, Vermeiden JP, Schoemaker J. Pregnancy following transcervical transfer of oocyte and sperm. *N Engl J Med* 1989;320:1499.
41. Forrler A, Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Cranz C, Clavert A, Rumpler Y. Direct intraperitoneal insemination in unexplained and cervical infertility. *Lancet* 1986;1:916-7.
42. Kahn JA, von Düring V, Sunde A, Sordal T, Molne K. Fallopian tube sperm perfusion: first clinical experience. *Hum-Reprod* 1992; Suppl 1:19-24.
43. Fishel S, Antinori S, Jackson P, Johnson J, Lisi F, Chiariello F, Versaci C. Twin birth after subzonal insemination. *Lancet* 1990;335:722-3.
44. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
45. Silber SJ. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril* 1988;49:373-5.
46. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil-Steril* 1994;62:639-41.
47. Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997;3:267-80.
48. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.

HOOFDSTUK II

De plaatsing van gameten, zygoten en embryo's in de eileider

DEEL 1

Inleiding tubaire embryoplaatsingstechnieken

Uit meerdere oogpunten is de eileider de meest aangewezen plaats voor gameet- en embryo-transfer. Bij de mens komt het embryo 96 uur na de LH piek en 81 uur na de ovulatie als morula in het cavum uteri. Eerst is er een verblijf van ± 72 uur in de ampulla van de eileider (1), daarna een snel transport door de isthmus. Proefdierstudies geven de basis voor de plaatsing van embryo's in de eileider (2,3,4,5).

De abusievelijk gebruikte term "terugplaatsing", want de bevruchte eicel(len) waren als zodanig niet voorheen in de eileider of uterus aanwezig, zal niet worden gebruikt en kan door "plaatsing" of het engelse woord "transfer" worden vervangen.

Bij de mens werden de eerste embryoplaatsingen naar de uterus gedaan (6). Echter, de complexe kweek van embryo's was aanvankelijk een beperking en daarom probeerde men het in-vitro kweken te omzeilen. Het was bekend uit dierexperimenten dat met transfer van gameten of embryo's naar de eileider goede resultaten behaald konden worden (4,7,8) vanwege de synchronisatie tussen ontwikkeling en positie van het embryo. Door het vroegtijdig plaatsen van gameten of embryo's in de eileider werd de duur van de extracorporale kweek beperkt tot een minimum.

Tevens kon deze techniek goed aansluiten aan de diagnostische laparoscopie van de genitalia interna die inmiddels tot de standaard diagnostiek van de infertiliteit hoorde.

Bij een normale toe- en doorgankelijkheid van de eileider kon men bij dezelfde behandeling gameten in de eileider brengen, ook als er eventueel endometriose of adhaesies waren (9,10,11,12).

Vooraf bij paren met een onverklaarde infertiliteit (13) of een vermoede andrologische oorzaak van onvruchtbaarheid (14) leek dit aantrekkelijk.

De tubaire embryoplaatsingstechnieken hebben in de 90er jaren hun plaats grotendeels verloren ondanks een veelbelovend begin.

Laparoscopische technieken

-Gamete Intra Fallopian Transfer (GIFT)

De eerste melding in 1979 van gametentransfer (15) betrof een refertilisatie-operatie, waarbij met voorafgaande hyperstimulatie door clomifeencitraat, eicellen in de tuba werden gebracht. De inseminatie werd 12 uur van tevoren per vaginam uitgevoerd.

In 1983 beschreef Tesarik (16) een transfer per laparotomie in combinatie met een microchirurgische ingreep. In deze vorm was GIFT uiteraard beperkt toepasbaar, omdat een laparotomie niet acceptabel zou zijn als de transfer als enige indicatie voor de ingreep zou gelden.

Na de ontwikkeling van de laparoscopische transfer door Asch (13) werd deze snel wereldwijd ingevoerd met goede zwangerschapscijfers. Deze worden verklaard met goede synchronisatie, weinig nadelige invloeden van kweken en het snelle atraumatische inbrengen van gameten. In het begin van de tachtiger jaren waren de catheters voor intra-uteriene transfer nog niet optimaal, mogelijk door het gebruik van embryotoxisch en mogelijk beschadigend materiaal. Technische verschillen bij de uitvoering van uteriene plaatsing zijn ook nu nog een verklaring voor verschillen in zwangerschapspercentages na IVF. Technische aspecten verdienen altijd grote aandacht bij IVF.

De indicatie voor GIFT was aanvankelijk onverklaarde infertiliteit (13). Bij gebleken kansrijkheid van de methode kwamen er andere indicaties: mannelijke subfertiliteit en immunologische infertiliteit, doch daarbij waren de resultaten minder bemoedigend (14,17,18,19,20). Een samenvatting van resultaten van vergelijkende studies wordt gegeven in tabel I.

In deze tabel zijn studies samengevat, waarin GIFT met IVF vergeleken wordt. De zwangerschapspercentages zijn nagerekend tot implantatiepercentage per (terug)geplaatste eicel of embryo (tussen haakjes). De heterogeniteit van de studies ligt voor de hand, waardoor een gefundeerde conclusie onmogelijk is.

Tabel I. Vergelijkende studies tussen GIFT en IVF

<i>Auteur</i>	<i>Stat[§]</i>	<i>Indicatie GIFT/IVF</i>	<i>N cycli</i> <i>GIFT</i>	<i>% zwanger/ %impl/oöcyt</i>	<i>N cycli IVF-ET</i> <i>/ET-kans</i>	<i>%zwanger/ %impl/emb</i>
Yovich(1988) ²¹	R	1a,2,5/1	186	36(15*)	131/85%	12(4)
Hammitt(1990) ²²	R	3,4,5/1,3,4	49	47(18)	75/97%	27(11)
Tournaye(1991) ¹⁴	R	2/2	45	18(6)	79/48%	29(14)
Bollen(1991) ²³	R	1a,2,3,4,5/1,1a,2,3,4,5	190	19(8)	713/77%*	28(14)
Mills†(1992) ²⁴	R	3,4/1	47	40(21)	60/†	28(11)
Leeton(1987) ²⁵	P	2,4/2,4	43	21(5)	37/86%	25(10)
Tanbo(1990) ²⁶	P	2,3,4/2,3,4	42	26(7)	42/83%	46(16)
Crosignani(1991) ²⁷	P	4/4	114#	28(?)	77#/?	23(?)
Craft(1992) ²⁵	R	6	157	36(?)	113	30(?)

(naar Tournaye et al,1996)(93)

* TFF (total fertilization failure)+ slechte celdeling

† Alle patiënten voorheen 1x IVF-ET

Alle eerste cycli

§ Statistiek: R: retrospectief P: prospectief

Indicatie:	1.tubair	1a.tubair na chirurgie	2.andrologisch	3.endometriose
	4.idiopathisch	5.andere	6.onbekend	

Vergelijking is wel complex omdat het zwangerschapspercentage bij GIFT per cyclus en bij IVF per ET berekend wordt. Al naar gelang het gemiddelde bevruchtungs-percentage bij IVF zou een negatieve correctie van de IVF cijfers mogen plaatsvinden. Dit komt in het bijzonder tot uiting bij indicaties waarbij "Total Fertilisation Failure (TFF)" vaker voorkomt, immers werkt bij TFF dit in het voordeel van de IVF omdat per ET gerekend wordt en bij GIFT per poging.

Een gerandomiseerde studie van voldoende grootte, met een zorgvuldige selectie van de paren naar indicatiestelling, zou een definitief antwoord kunnen geven op de vraag of er nog of misschien weer plaats is voor GIFT. Het feitelijk beperkte indicatie gebied, de onverklaarde in-

fertiliteit, lijkt een dergelijke studie op zijn minst te bemoeilijken. Bovendien zijn er bezwaren tegen een invasieve ingreep en logistieke nadelen. In Nederland wordt GIFT niet meer uitgevoerd.

-Zygote Intra Fallopian Transfer (ZIFT)

Voortgaande op GIFT kwam het in-vitro bevruchten van de eicel en kweken tot het 2 pronucleï-stadium, waarna laparoscopische overdracht naar de ampulla van de eileider. Weliswaar bracht men nu een bewezen bevruchte eicel over, maar de vrouw onderging zowel een follikelpunctie als na 1 dag een laparoscopie voor de embryoplaatsing.

De in-vitro-selectie beperkt zich bij ZIFT tot het vaststellen van eventuele afwijkende bevruchting, zoals 3 pronucleï. Daarentegen zijn bij langer kweken dan 1 dag tijdens de embryonale ontwikkeling natuurlijke selectiemechanismen aanwezig zoals klievingssnelheid, fragmentatie, activatie van het genoom en blastocystevorming, die het mogelijk maken een keuze te maken uit een aantal bevruchte eicellen.

Balmaceda voerde aanvankelijk "Tubal embryo transfer" in het 2 pronucleï stadium uit (29), later pas na 44 uur, in het 4 cellig stadium (30). Embryoselectie behoorde daar tot de mogelijkheden. Overigens vond de embryoplaatsing in deze studies per mini-laparotomie of laparoscopie plaats.

De indicaties voor ZIFT waren ruimer dan voor GIFT, daar paren met vermoede andrologische infertiliteit en sperma-antilichamen met ZIFT behandeld konden worden.

Ook bij ZIFT leken de aanvankelijke resultaten een succes, gezien het zwangerschapsperscentage van 14-53% en implantatie per embryo tussen 7 en 24% (Tabel II). De corresponderende implantatiepercentages per embryo bij IVF-ET waren bij de eerste studies lager (Tabel II). Latere vergelijkende studies relativeerden echter deze bevindingen en bevestigden de gepostuleerde voordelen niet. Ook een recente studie uit 1998 van Levran bij patiënten met herhaalde mislukte IVF pogingen is niet overtuigend.

GIFT en ZIFT worden klinisch nauwelijks meer toegepast. De nadelen van ZIFT, zoals de invasieve techniek, logistieke moeilijkheden bij het plannen van OK-ruimte het kostenaspect verhinderden een brede toepassing, vooral in landen waar voortplantingsgeneeskunde niet primair klinisch plaatsvindt.

Tabel II. Vergelijkende studie tussen ZIFT en IVF

<i>Auteur</i>	<i>Stat</i>	<i>Indicatie</i> <i>ZIFT/IVF</i>	<i>N cycli</i> <i>ZIFT</i>	<i>% zwanger/ % implantatief embryo</i>	<i>N cycli</i> <i>IVF-ET</i>	<i>% zwanger/ % implantatief embryo</i>
Yovich(1988) ²¹	R	2,4,5/1	81	37(17)	112	12(4)
Devroey(1989) ³¹	R	4/4	54	48(24)	87	22(11)
Pool(1990) ³²	R	2,3,4,5/1,2	114	40(17)	114	21(8)
Hammitt(1990) ³²	R	2,3,4,5/1,1a	63	52(20)	78	27(11)
Asch(1991) ³³	R	2,3,4,5/1,1a	126	53(18)	232	22(9)
Bollen†(1991) ³³	R	1a,2,3,4,5/1	161	38(18)	713	28(14)
Tournaye(1991) ¹⁴	R	2/2	110	21(13)	163	29(14)
Tanbo(1990) ²⁶	P	2,3,4/2,3,4	29	37(10)	35	46(16)
Tournaye(1992) ³⁴	P	2/2	34	27(12)	46	22(10)
Balmaceda*(1992) ³⁰	P	5/5	22	58(21)	20	55(17)
Fluker(1993) ³⁵	P	2,3,4,5/2,3,4,5	21	14(7)	31	29(10)
Menezo(1996) ³⁶	R	6	137	28(13)	217	28(19)
Levrant(1998) ³⁷	P	2,4	70	34(9)	70	17(4)

(naar Tournaye et al,1996)(93).

Statistiek: R: retrospectief P: prospectief

† Alleen transfers met 3 embryo's

*alleen ovum donation receptors

Indicatie:	1.tubair	1a.tubair na chirurgie	2.andrologisch	3.endometrioze
	4.idiopathisch	5.andere	6.onbekend.	

Transcervicale plaatsingstechnieken

De ontwikkeling van een catheter voor transcervicale intratubaire plaatsing (38) van gameten (39), zygoten of eventueel verdere stadia in de embryonale ontwikkeling (40) ondervindt de nadelen van GIFT/ZIFT en leek vanaf 1988 een goed alternatief.

De naam transcervicale intrafallopian transfer ofwel TIFT werd door ons aan deze techniek gegeven, elders ook wel PROST(pronuclear stage transfer) en TET (tubal embryo transfer) genoemd.

Tegelijk werd een transcervicaal catheterisatiesysteem geïntroduceerd voor radiodiagnostische en therapeutische doeleinden (41,42,43).

De gunstige gepubliceerde zwangerschapscijfers van de GIFT / ZIFT leidden tot snelle verbreiding van de transcervicale techniek, maar nooit tot een hausse als die van GIFT en ZIFT. Het indicatiespectrum van TIFT is identiek aan dat van de GIFT / ZIFT.

Bij idiopatische infertiliteit en mannelijke subfertiliteit werden als alternatief voor intrauteriene inseminatie ook tubaire inseminaties na "Swim-up" uitgevoerd, de resultaten waren teleurstellend (ongepubliceerde data, Scholtes, Roozenburg), zodat hiervan verder werd afgezien.

Tabel III geeft een opsomming van studies over de verschillende vormen van toepassing van deze catheterisatietechniek.

Tabel III. Transcervicale Intra Fallopian Transfer: Overzicht van studies.

<i>Auteur</i>	<i>Indicatie</i>	<i>Transfer stadium</i>	<i>Techniek tuba transfer/ catheterisatie</i>	<i>N cycli TIFT</i>	<i>% zwanger/ % impl./ emb.</i>	<i>N cycli IVF</i>	<i>% zwanger/ % impl./ emb.</i>
Scholtes(1990) ⁴⁴	2,4/2,4	2PN	US	25	34/14	35	26/8
Risquez(1990) ⁴⁵	1,2,3,4,5	2-4 cellig	Blind	28	18/?	-	
Yovich(1990) ⁴⁶	1,1a,2,5	2PN-6 cellig	US	17	18/8		
Diedrich(1991) ⁴⁷	2	4 cellig?	blind	95	31/18	-	
Ferraiolo(1991) ⁴⁸	1,2,3	gameet	blind	26	27/12	-	
Possati(1991) ⁴⁹	1,2,3,4	gameet	hysteroscopie	27	26/?		
Jansen(1993) ⁵⁰	4/4	gameet	blind	20	20/9	60	35/15
Scholtes(1994) ⁵¹	2,3,4,5/2,3,4,5	2PN/4-8 cellig	US	57	12/4	49	28/12
Porcu(1997) ⁵²	4	gameet	fallo-laparoscopie	25	28/?		
Kumar(1997) ⁵³	2,4/2,4	2-4 cellig	US	112	17/17	102	11/11

(naar Tournaye et al,1996)(93)

Indicatie: 1.tubair 1a.tubair na chirurgie 2.andrologisch 3.endometriose 4.idiopathisch 5.andere
US: echoscopisch geleide catheterisatie

Uit de cijfers in tabel III blijkt dat de positieve verwachtingen van TIFT niet konden worden bevestigd. In de enige prospectief gerandomiseerde studie (51) waren de resultaten na IVF-ET in vergelijking met TIFT significant beter. De negatieve ervaringen zijn terug te voeren op onjuiste catheterplaatsing, trauma van het endometrium en het endotheel van de tuba. Een nieuwe cathetertechnologie werd geïntroduceerd(52,53,54,55). In een studie van Kumar (53) wordt een technisch verbeterde catheter gebruikt. Er bleek geen statistisch significant verschil tussen beide methoden wat betreft zwangerschapspercentage. De benodigde tijd en kosten voor mankracht en materiaal vielen echter ten nadele van de catheter uit.

DEEL 2

Pilot studie over de plaatsing van zygoten via de cervix uteri in de eileider: Transcervical Intra Fallopian Transfer (TIFT) van zygoten.

(naar oorspronkelijk artikel in Fertil Steril 1990;54:283-286. Scholtes MCW, Roozenburg BJ, Alberda AT, Zeilmaker GH. Transcervical intra fallopian transfer of zygotes.)

Samenvatting

Gamete intra fallopian transfer(GIFT) en zygote intra fallopian transfer(ZIFT) werden succesvol bevonden bij kunstmatige voortplanting.

In deze pilotstudie worden de eerste resultaten van een recent ontwikkelde techniek beschreven waarbij de transfer per vaginam transcervicaal in de tuba fallopii plaatsvindt.

In een groep van 38 patiënten met onverklaarde infertiliteit werd een eicelpunctie verricht. Na bevruchting kon bij 25 patiënten een transfer met zygoten uitgevoerd worden. Bij 8 patiënten kon een positieve zwangerschapstest vastgesteld worden. Klinische en technische overwegingen rond deze methoden worden besproken.

Inleiding

Naar men aanneemt, vindt bij de mens in-vivo bevruchting plaats in het ampullaire gedeelte van de tuba fallopii (1). Zaadcellen migreren van het cervicaal slijm via de uterusholte naar de tubahoeken en van daaruit verder naar de eileiders.

Rond het tijdstip van de ovulatie is een glycoproteïneprop in de isthmus van de tuba aanwezig (56). Deze slijmprop bevordert de passage van zaadcellen in de tegenovergestelde richting van de ciliaire beweging (57). Mogelijk draagt deze prop ertoe bij dat de eicel of het embryo voor een bepaalde tijd in de ampulla van de eileider bewaard wordt. Verder transport van eicel (1) of embryo naar het cavum uteri komt op gang nadat de glycoproteïneprop opgelost is en berust in principe op de combinatie van ciliaire beweging van de mucosa met contracties van de muscularis van de eileider. Daar in vivo de bevruchting van de menselijke eicel in de eileider plaatsvindt, heeft zich in de voortplantingsgeneeskunde de aandacht toegespitst op de eileider als locatie voor de plaatsing van gameten, zygoten of embryo's.

In 1986 werd "Gamete Intra Fallopian Transfer" (58) geïntroduceerd, kort daarop "Zygote Intra Fallopian Transfer" (59). Deze procedures werden per laparoscopie uitgevoerd. Onlangs werd een nieuwe methode ontwikkeld om per vaginam transcervicaal de eileider te catheteriseren (38). Deze benaderingswijze kan worden toegepast om te insemineren en om gameten of embryo's in de eileider terug te plaatsen (39,40,60).

Het doel van deze pilotstudie was de inzetbaarheid van deze methode te testen bij plaatsing van zygoten.

Materiaal en methoden

In december 1988 werd door het IVF-team van het Dijkzigt ziekenhuis te Rotterdam begonnen met het rekruteren van patiënten voor deze studie. De patiënten die uit de IVF-populatie werden geselecteerd hadden onverklaarde infertiliteit (3-14 jaar, mediaan 5 jaar), bij 4 echtparen was er tevens sprake van een bijkomstige geringe mannelijke subfertiliteit, wat betreft zaadcelconcentraties tussen 10 en $20 \cdot 10^6$ per ml. De leeftijd van de vrouwelijke patiënten was 25 - 41 jaar, mediaan 35 jaar.

De eileiders moesten doorgankelijk zijn, vastgesteld aan de hand van hysterosalpingografie en laparoscopie.

De ovariële hyperstimulatie vond plaats met hetzelfde regime als gebruikt voor andere IVF indicaties in deze kliniek (61). Ook echoscopisch onderzoek, eicelpunctie, de bevruchting en verdere celkweek waren identiek bij patiënten die transfer d.m.v. de TIFT of IVF kregen.

Maximaal 4 zygoten werden 24 uur na de inseminatie geplaatst.

De TIFT werd uitgevoerd met een speciale catheter (KJITS 1000; William Cook BV, Eindhoven). Deze catheter was samengesteld uit een buitencatheter met een vaste hoek aan de tip, een buigbare mandrijn en een flexibele binnencatheter, die na het positioneren van de buitencatheter opgevoerd werd. Het bijzondere aan de binnencatheter is het dunnere uiteinde met een diameter van 0,66 mm. Bij volledig opgevoerde binnencatheter stak deze maximaal 5 cm uit de buitencatheter.

De driedimensionale positie van de uterus werd voor het uitvoeren van de procedure door transvaginale echoscopie (Kretz combison 350-5, 5-7.5 MHz; Kretztechnik GmbH, Zipf, Oostenrijk) vastgelegd. De patiënt werd in een dorsale steensnedeliggingspositie geplaatst.

Na inbrengen van het speculum werd de cervix uteri gereinigd met behulp van steriele

wattenstokjes. Aangezien de hoek van het cervicaalkanaal ten opzichte van het cavum uteri bekend was, kon de mandrijn naar behoeven voorgebogen worden. Na de passage van het cervicaalkanaal kon de catheter 90° om zijn as gedraaid worden voor een juiste positionering in de tubahoek. De eileider, waar de meeste corpora lutea zichtbaar waren, werd bij voorkeur gebruikt voor de TIFT. Na het verwijderen van de mandrijn werd de binnencatheter geladen met maximaal 4 zygoten (mediaan 3,2) en opgevoerd

Het inbrengen van de binnencatheter in de tuba werd met geringe axiale druk uitgevoerd

De terugplaatsing werd aanvankelijk bij de eerste patiënt met vaginale echoscopie gecontroleerd, uit praktische overwegingen echter werd dit later transabdominaal gedaan.

In de meeste gevallen was het goed mogelijk de catheter in het cavum uteri te visualiseren, alleen bij extreme retroversie/flexie van de uterus was dit niet doenlijk. Bovendien bleek het in de meeste gevallen mogelijk de binnencatheter in de eileider eveneens in beeld te brengen. Bij één casus waar de binnencatheter zich niet gemakkelijk liet opvoeren, kon echoscopisch vastgesteld worden dat de binnencatheter zich in de uterus oprolde. Er was geen aparte anesthesie nodig gedurende de ingreep. Na de TIFT kon in tegenstelling tot de embryoplaatsing na IVF de patiënt direct opstaan, zonder verdere instructie om het rustig aan te doen.

De luteale suppletie bestond uit het in deze kliniek (destijds) gebruikelijke schema van 5000 IU hCG (Pregnyl; Organon, Oss) op de dag van de eicelpunctie en 2 en 4 dagen later.

Een zwangerschapstest in de urine werd ten vroegste 16 dagen na de eicelpunctie verricht, een intacte zwangerschap werd ongeveer 35 dagen na de eicelpunctie met echoscopisch onderzoek vastgesteld.

Resultaten

Gedurende de periode van december 1988 tot juni 1989, namen 38 patiënten deel aan het TIFT-programma. In 35 gevallen kon een eicelpunctie gedaan worden, bij 3 patiënten trad een voortijdige ovulatie op, vastgesteld met het echoscopisch verdwijnen van follikels.

De mediaan van het aantal eicellen bij de punctie bedroeg 7 (range 2-25).

Bij 25 (71%) patiënten werd bevruchting van één of meer eicellen verkregen. In de overige 10 casus (29%) werd in het geheel geen bevruchting gevonden na 24 uur. Bij 2 patiënten uit deze groep van 10 bleek er sprake van de voornoemde subfertiliteit van de man. Voor alle zekerheid werd bij deze gevallen van niet bevruchten na 24 nogmaals gecontroleerd om eventuele

vertraagde bevruchting uit te sluiten. Dit fenomeen deed zich echter in deze patiëntengroep niet voor.

Zoals reeds vermeld, was de mediaan van het aantal geplaatste zygoten 3,2 , eventuele overgebleven embryo's werden, indien mogelijk, ingevroren.

De catheterisatietechniek leverde aanvankelijk soms technische problemen op zoals het stoken van het invoeren van de catheter, hetgeen bleek te berusten op afknikken van de binnencatheter in de uterushoek. Waarschijnlijk was dit te wijten aan het uitoefenen van een te grote axiale druk bij het inbrengen van de binnencatheter in de tubahoek. Na de transferprocedure werd de catheter, zoals bij IVF gebruikelijk, onderzocht op achtergebleven embryo's. Hierbij konden onder de dissectiemicroscoop oppervlakkige vouwtjes gezien worden, zonder dat hierdoor meteen het lumen van de catheter geobstrueerd werd.

In deze pilotstudie werden geen complicaties gezien. Uit de TIFT-groep werden 8 patiënten zwanger (β -hCG >50 IU/L), bij echoscopisch onderzoek konden 7 intacte zwangerschappen vastgesteld worden, 4 éénlingen en 3 tweelingen. Van deze zwangerschappen waren er 5 doorgaand.

Eén patiënt werd in de cyclus na de TIFT spontaan zwanger na een onverklaarde infertiliteit van 5 jaar.

Er werd uit dezelfde onderzoeksperiode gerandomiseerd een controlegroep IVF-patiënten samengesteld, bestaande uit vergelijkbare patiënten met niet-tubaire infertiliteit, zie tabel IV. In deze IVF controlegroep werden 45 eicelpuncties verricht, bij 10 patiënten bleef bevruchting na 24 uur uit. Er werden 9 zwangerschappen in deze groep aangetoond (20% per punctie en 26% per transfer). In de controlegroep was de mediaan van het aantal gevonden eicellen 7,4, range 1-21), de mediaan van het aantal teruggeplaatste embryo's 3.2 (range 1-5).

Tabel IV. Resultaten van de Pilotstudie TIFT versus een geselecteerde IVF groep.

	<i>n</i>	<i>TIFT</i>			<i>n</i>	<i>IVF-ET</i>		
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
	%	%	%	%	%	%		
A.Cycli	38				54			
B.Eicelpunctie	35	92			45	83		
C.Transfer	25	66	71		35	65	77	
Zwangerschap	8	21	23	32	9	17	20	26

Discussie

Aangezien de patiëntengroep uit paren met onverklaarde infertiliteit bestond, was het constateren van bevruchting van de eicellen tevens een belangrijk diagnostisch gegeven. Uit deze data blijkt er in 10 van de 35 casus (29%) sprake van een totaal ontbreken van bevruchting. Deze informatie ontbreekt wanneer de GIFT-methode (62) wordt toegepast. Transcervicale Intra Fallopian Transfer van gameten zou dus pas overwogen dienen te worden als er van te voren in-vitro bevruchting opgetreden zou zijn. Bij GIFT zou de manipulatie van gameten geminimaliseerd worden en de synchronisatie tussen gameten, bevruchting en positie in de tractus genitalis van de vrouw optimaal zijn. Theoretisch (63) zou dus de geassisteerde voortplanting het meest efficiënt zijn als gameten in de tuba worden geplaatst. Als er echter sperma-antilichamen bij de vrouw aanwezig zijn, dan zou de transfer van zygoten of embryo's de voorkeur verdienen.

De exacte functie van de glycoproteïneprop, die rondom het tijdstip van de eisprong in de isthmus (56) van de tuba aangetroffen wordt, is nog niet geheel duidelijk. Mogelijk is de fysiologische functie verklaard door een rol bij de migratie van zaadcellen (57). Andere hypothesen gaan in de richting van een functie als spermafilter of -opslag (64) of als mechanische barrière waardoor het pasgevormde embryo tijdelijk in de ampulla blijft.

De catheterisatie van één van de eileiders in een voorafgaande cyclus kan misschien ten grondslag gelegen hebben aan de zwangerschap bij één van de patiënten die in de daaropvolgende cyclus spontaan zwanger werd. Het is inderdaad bekend dat transcervicale catheterisatie kan leiden tot rekanalisatie van de eileider. Debris van amorf materiaal (65) zou daarbij door catheterisatie uit de weg geruimd kunnen zijn.

Hoewel echoscopisch het juiste positioneren van de catheter werd gecontroleerd, zou het in feite in de meeste gevallen mogelijk zijn om blind de binnencatheter op te voeren. Waarschijnlijk wordt de as van het cervicaal kanaal en het cavum uteri, als de patiënt een volle blaas heeft, in één vlak gebracht. De vector van de kracht die op de binnencatheter uitgeoefend wordt ligt dan in hetzelfde vlak, waardoor het aanbrengen makkelijker gelukt.

In deze studie werden geen complicaties gezien, theoretisch zou een infectie of extra-uteriene zwangerschap (EUG) eventueel kunnen optreden. Het aantal EUG's dat in de toekomst bij de TIFT optreedt, zou een indicatie kunnen zijn in hoeverre dit een techniek gerelateerde complicatie is, daar ook bij intra-uteriene embryoplantsing een EUG kan optreden. In de vervolgstudie van dit pilotproject werd overigens een EUG gediagnostiseerd.

Het plaatsen van gameten of embryo's in de eileider zou het zwangerschapspercentage en verdere ontwikkeling gunstig kunnen beïnvloeden. De resultaten van GIFT (59) en ZIFT (66) lijken deze hypothese te ondersteunen. Sommige auteurs hebben data gepubliceerd die moeten bewijzen dat GIFT en ZIFT efficiënter zouden zijn in vergelijking met intra-uteriene plaatsing van een embryo bij IVF (63,67). De data uit deze studie laten echter nog geen statistisch gefundeerde conclusie toe.

Gegevens uit dierexperimenteel onderzoek tonen aan dat bevruchting en vroege embryonale ontwikkeling positief worden beïnvloed door tubaepitheel (68,69,70).

Factoren zoals de electrolytenconcentratie (71) en eiwitsamenstelling (72) van het milieu in de tuba en de endocriene stimulatie (73,74) van de eileider zouden bevruchting, transport en ontwikkeling van het embryo kunnen beïnvloeden. Gedurende de menstruele cyclus is er een dynamische verandering (75) van deze processen.

In deze studie werd de voorkeur gegeven aan plaatsing van zygoten in de eileider, met name vanwege het diagnostische aspect bij de behandeling van onverklaarde infertiliteit. Een verdere embryoselectie, met positieve effecten voor het zwangerschapscijfer, zoals uit een eerdere publicatie van onze groep (76) bleek, is hierbij echter niet mogelijk.

Transvaginaal, transcervicaal kunnen gameten en zygoten worden geplaatst. Er is geen anesthesie nodig, de procedure is relatief eenvoudig en kan poliklinisch uitgevoerd worden. Zoals eerder vermeld zijn er te weinig waarnemingen gedaan voor een gefundeerde uitspraak omtrent de betekenis van de methode.

Het is verder noodzakelijk een zorgvuldige patiëntselectie uit te voeren met betrekking tot de kwaliteit van de eileiders, alvorens deze techniek toe te passen.

In bepaalde gevallen zou TIFT mogelijk een serieuze concurrent voor laparoscopische voortplantingstechnieken kunnen zijn.

DEEL 3

Een gerandomiseerde studie over transcervicale intratubaire plaatsing van zygoten onder echoscopische controle versus intra-uteriene plaatsing van 4-8 cellige embryo's.

(naar oorspronkelijk artikel Fertil Steril 1994;61:102-4. Scholtes MCW, Roozenburg BJ, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A randomized study of transcervical intra fallopian transfer of pronucleate embryos controlled by ultrasound versus intrauterine transfer of four- to eight-cell embryos.)

Samenvatting

Deze studie werd opgezet om de klinische waarde van transcervicale intratubaire plaatsing van zygoten ofwel "Transcervical Intra Fallopian Transfer (TIFT)" (n=57) te bepalen en om de nauwkeurigheid van tubacatherisatie te toetsen. Echoscopisch geleide transcervicale intra fallopian transfer van zygoten werd prospectief gerandomiseerd vergeleken met intra-uteriene transfer van gedeelde embryo's (n=49). De studie vond plaats op de afdeling gynaecologie van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt te Rotterdam. De patiënten die aan het onderzoek deelnamen werden geselecteerd uit de IVF populatie, waarbij doorgankelijke eileiders als voorwaarde gold. Honderd vijfenveertig patiënten voldeden aan dit criterium en participeerden. Als maatstaf voor de vergelijking van beide technieken werd het zwangerschapspercentage gekozen alsmede ter beoordeling van de juiste plaatsing van de intratubaire catheter, het echoscopische aspect van de catheter in de eileider.

Het bleek dat de transvaginale/cervicale plaatsing van de catheter niet voldoende nauwkeurig verliep zonder echoscopische begeleiding. De catheter werd in vele gevallen tijdens de procedure beschadigd. De eerder gemelde hogere implantatiekans per embryo na intratubaire plaatsing kon, na vergelijking met intra-uteriene transfer, niet bevestigd worden.

De conclusie van deze studie moet luiden dat de klassieke intra-uteriene plaatsing van embryo's de voorkeur blijft houden.

Inleiding

De tuba fallopii kreeg in de voortplantingsgeneeskunde (39,40,42,43,44,45,46,47,48,50)

betekenis als alternatief voor het cavum uteri als locatie voor ingebrachte gameten en embryo's; in het bijzonder bij patiënten waarbij minstens één eileider doorgankelijk was.

Er werden successen gemeld na laparoscopische intratubaire plaatsing van gameten (58) en embryo's in het pronucleus stadium (59), de resultaten hiervan leken in vergelijking met IVF-ET erg gunstig (21,66,67,77). Deze positieve resultaten werden verklaard door selectie van patiënten waarvan de eileiders doorgankelijk zijn. In deze gevallen lijkt de eileider als plaats om embryo's of zygoten te plaatsen bruikbaar. Een methode waarvan laparoscopie onvermijdelijk deel uit maakt is echter maar beperkt inzetbaar.

Na de invoering van de transcervicale catheterisatie van de eileider en plaatsing van embryo's en zygoten in de tuba fallopii (38,40), werd deze methode ook in onze groep in een pilot-studie getest (44).

Hierna werd een prospectief gerandomiseerde studie geïnitieerd om deze nieuwe techniek te evalueren. Er werd een vergelijking gemaakt tussen echoscopisch geleide transcervicale intratubaire plaatsing (TIFT) en de klassieke intra-uteriene transfer (IVF-ET). Tegelijkertijd werd tevens de plaatsing van de tubacatheter achteraf met behulp van transabdominale echoscopie getoetst.

Materiaal en methoden

De onderzoekspopulatie werd samengesteld uit patiënten die in het IVF programma werden opgenomen door de universiteitskliniek en door een lid van de cluster. Vanuit het Zuiderziekenhuis te Rotterdam vond eiceltransport (78) plaats naar het IVF-lab van de Erasmus Universiteit, de transfers werden in de polikliniek van het Academisch Ziekenhuis uitgevoerd.

De participerende patiënten gaven toestemming tot deelname aan de studie na informatie over de aard, opzet en intentie van het project.

De randomisatie werd afhankelijk gemaakt van de weekdag waarop de menstruatie voor de behandelingscyclus plaatsvond.

De leeftijd van de patiënten lag tussen de 23 en 44 jaar (mediaan 33.4, SD \pm 3.6). De mediaan van de duur van de infertiliteit was 7 jaar, SD \pm 2.4 jaar.

Alle patiënten hadden ten minste één doorgankelijke eileider, bevestigd door hysterosalpingogram en/of laparoscopie. Uteriene afwijkingen werden middels echoscopisch onderzoek uit-

gesloten. Er werden ook casus met geringe mannelijke subfertiliteit in de studie opgenomen, weliswaar onder de voorwaarde dat een sperma-analyse kort tevoren aan de criteria voor IVF moest voldoen (zaadcelconcentratie $>10 \cdot 10^6$ en een acceptabele opzwemtest).

De samenstelling van beide groepen voor wat betreft de indicatiestelling was vergelijkbaar. Bij transcervicale transfer versus IVF-ET, onverklaarde infertiliteit in 65%, respectievelijk 69%, endometriose respectievelijk 5% en 4%, mannelijke factor in 25% respectievelijk 22%, cervix factor 2% in beide groepen.

De ovariële hyperstimulatie bestond uit de toediening van 225 IU hMG/per dag, vanaf cyclusdag 3, in vele gevallen in combinatie met buscreline acetaat vanaf dag 23 in de cyclus voor de stimulatiecyclus. De eicelpunctie werd 35 uur na de toediening van 10.000 IU hCG uitgevoerd, onder echoscopische controle van een Kretz Combison 350 scanner (Kretz Technik, Zipf, Oostenrijk) met een transvaginale vaginale kop (5.0 MHz.).

De eicellen en embryo's ondergingen een bewerking en celkweek zoals reeds beschreven werd (79).

Nadat de bevruchting vastgesteld werd, voerde een van de artsen uit het IVF-team de plaatsing van zygoten of embryo's uit. TIFT werd 24 uur na de eicelpunctie gedaan (186 zygoten), intra-uteriene plaatsing na 48-72 uur (139 embryo's). Er werden maximaal 4 embryo's geplaatst.

De TIFT procedure werd uitgevoerd met een tubacatheterisatieset (KJITS 1000, William Cook Australia Pty Ltd, Melbourne, Australië) zoals eerder vermeld (44).

Met behulp van transabdominale echoscopie werd tijdens de TIFT-procedure de juiste, blinde, plaatsing van de catheter door een tweede arts uit het IVF team met voldoende echoscopische ervaring gecontroleerd.

Bij voorkeur werd de plaatsing van zygoten gedaan aan die kant, waar de meeste corpora lutea zichtbaar waren, aangezien in een studie met Doppler echo werd aangetoond dat de tuba doorbloeding daar het beste zou zijn (80). Na de plaatsing werd de catheter doorgespoeld met kweekmedium om te controleren of daadwerkelijk alle zygoten uit de catheter waren.

De intra-uteriene transfer van 4-8 cellige embryo's werd uitgevoerd met een variant van de Frydman catheter (TDT, Parijs, Frankrijk). De binnencatheter werd pas gevuld zodra de buitentcatheter intra-cervicaal aangebracht was.

Resultaten

Na de randomisatieprocedure kwamen 57 patiënten in de groep waarbij TIFT werd uitgevoerd en 49 waarbij IVF-ET plaatsvond. Bij de overige 39 patiënten vond geen bevruchting plaats.

Bij de echoscopische controle van de TIFT werd in 7 gevallen vastgesteld dat men ten onrechte in de veronderstelling verkeerde dat de catheter in de juiste positie was. Bij 10 andere patiënten moest na een mislukte catheterisatie aan de ene kant, de andere eileider gecatheteriseerd worden.

Ook bij patiënten waarbij gevoelsmatig de catheterisatieprocedure probleemloos verliep, kwam knikken en rimpelen van de catheter voor. In 10 andere gevallen trad eveneens een dergelijke catheterschade op. In totaal bij 16 patiënten werd in één of andere vorm catheterbeschadiging vastgesteld.

Van de 57 TIFT-patiënten werden 7 patiënten zwanger. Van deze zwangerschappen werden er vijf uitgedragen, daarnaast vond één abortus plaats en werd één extra uteriene graviditeit vastgesteld. Bij één van deze patiënten was de catheterisatie moeizaam verlopen.

In de groep van 49 patiënten met IVF-ET traden zestien zwangerschappen op, 4 abortus en 12 uitgedragen zwangerschappen. Er kon een statistisch significant verschil in zwangerschapspercentage tussen TIFT van zygoten en de klassieke intra-uteriene terugplaatsing van 4-8 cellige embryo's vastgesteld worden (Fisher's exact test, $P < 0,02$).

Het implantatiepercentage per embryo was in de groep van de TIFT patiënten 4% per zygote, daarentegen in de groep met IVF-ET 12% per 4-8 cellig embryo (Fisher's exact test, $P = 0,01$).

Bijwerkingen werden slechts in een beperkt aantal patiënten aangetroffen, in 9% traden pijnklachten in de vorm van uteriene krampen op. In het algemeen was voor de klassieke intra-uteriene plaatsing van embryo's de helft van de tijd nodig die voor de TIFT gebruikt werd.

Discussie

Deze gegevens tonen aan dat onder de huidige omstandigheden de TIFT van zygoten geen hoger zwangerschapspercentage oplevert in vergelijking met de klassieke intra-uteriene plaatsing van embryo's naar het cavum uteri. Het implantatiepercentage per zygote bleek veel lager

dan dat per embryo in een later stadium van de embryonale ontwikkeling. Deze resultaten staan lijnrecht tegenover de resultaten die na GIFT en ZIFT in de literatuur (81,82) gemeld worden. GIFT en ZIFT worden in de literatuur als een realistisch alternatief voor IVF beschouwd bij patiënten met normale eileiders.

Er zijn enkele verklaringen mogelijk voor het opvallende verschil in resultaat tussen transcervicale en laparoscopische technieken. Bij een laparoscopie wordt onder direct zicht de catheter met gameten, zygotes of embryo's in de eileider aangebracht. Bovendien is geen wezenlijke drukverhoging nodig om de catheter te ledigen tijdens de ampullaire transfer.

Bij de isthmische plaatsingstechniek is de catheterdiameter veel geringer. De plaatsing van de transcervicale catheter vereist een veel meer ervaren operateur dan de relatief simpele laparoscopische pendant en is bovendien, blijkens de echoscopische controle nog onbetrouwbaar voor wat betreft de juiste plaatsing van de catheter.

Gedurende de eerder uitgevoerde pilotstudie werd de terugplaatsing slechts door één operateur gedaan, bij deze gerandomiseerde studie evenwel door 4 IVF-artsen.

In een andere studie (47) worden betere zwangerschapsresultaten vermeld na de intratubaire plaatsing van 2-4 cellige embryo's via een catheter. Weliswaar betrof dit een niet-gerandomiseerde studie en werd geen vergelijking gemaakt met de IVF-ET resultaten van embryo's in hetzelfde ontwikkelingsstadium.

Het is technisch lastig vast te stellen hoe diep de tubahoek gecatheteriseerd is. Het is denkbaar dat als gevolg hiervan mogelijk door terugvloed de zygotes in het cavum uteri belanden. Mede door de technische moeilijkheden bij de catheterisatie zoals het afknikken van de catheter kan het tot een ongewenste drukverhoging komen tijdens de TIFT-procedure.

Concluderend mag gesteld worden dat, ondanks alle theoretische voordelen, de TIFT-methode momenteel geen plaats heeft als alternatief voor IVF-ET in de voortplantingsgeneeskunde. Het implantatiepercentage per geplaatste zygote of embryo zou hiervoor significant hoger moeten zijn dan bij IVF-ET of eventueel een laparoscopische procedure. Verdere technische ontwikkelingen en verbeteringen van de TIFT-methode zijn nodig om laparoscopische procedures, die zoals bekend een hoger complicatiepercentage hebben, overbodig te maken. Het is de echter de vraag of de gepostuleerde hogere zwangerschapspercentages bij laparoscopische voortplantingstechnieken wel opwegen tegen de risico's die tevens aan deze benaderingswijzen kleven.

Samenvatting en conclusies

De voor- en nadelen van laparoscopische en transvaginale tubaire plaatsing worden in tabel V samengevat. De voornaamste pluspunten voor de intratubaire technieken zijn:

1. het optimale milieu voor de ontwikkeling van bevruchte eicellen en
2. de synchronisatie van embryo(s) met het endometrium ten tijde van de intrede in het cavum uteri.

In het bijzonder zou in vivo minder zona pellucida verharding (83) optreden en de embryonale ontwikkeling van cryo-embryo's beter verlopen (84,85).

Laparoscopische technieken veroorzaken minimaal of geen trauma aan de tuba mucosa/muscularis en het endometrium.

Hoe verder het ontwikkelingsstadium (gameet, zygote of embryo) des te meer informatie bestaat over bevruchting en embryonale ontwikkeling. Indien langer gewacht wordt met een tubaire plaatsing wordt het voordeel van verder kweken in het tubaire milieu steeds kleiner.

Er blijken duidelijke verschillen te bestaan tussen de zwangerschapsresultaten van de Europese centra en de veel betere uit Australië (Trounson & Wood,86) en de USA (SART,87). Aan meerlingzwangerschappen wordt vrij weinig aandacht geschonken, in geselecteerde patiëntengroepen (23) blijkt het aantal meerlingzwangerschappen hoog te zijn.

Een ander probleem bij de beoordeling van deze studies is dat de zwangerschaps- en eventueel implantatiepercentages na plaatsing van embryo's in een verschillend ontwikkelingsstadium worden vergeleken. Bijvoorbeeld gameten bij GIFT in vergelijking tot 4-8 cellige embryo's bij IVF. Bovendien wordt bij de GIFT het zwangerschapspercentage per procedure of eventueel per oöcyt berekend. Dit in tegenstelling tot de ZIFT- of IVF-procedures, waar de succespercentages per transfer worden uitgedrukt.

Gezien a: het percentage van de pronucleus stadia dat verder deelt en b: de verdere toename van implantatiekans per embryo met het voortschrijden van de embryonale ontwikkeling door natuurlijke selectie (76,88), scoren de tubaire procedures niet echt slecht. GIFT en ZIFT kunnen slechts plaats vinden in combinatie met laparoscopie.

Een nuchtere beschouwing tussen laparoscopische en transvaginale intratubaire benaderingswijzen laat vermoeden dat de matige zwangerschapscijfers van de transcervicale methode berusten op traumatische effecten en onvolkomendheden van de catheterisatie.

Het werk van Menezo (36) in tabel VI toont aan dat met embryo's, gekweekt in co-cultuur (89,90,91), de gepostuleerde voordelen van kweken in het tubaire milieu nagebootst worden.

In de ZIFT-groep wordt geen selectie tot blastocyste afgewacht; in de controlegroep met blastocyste wel. Een blastocysteplaatsing blijkt echter lang niet altijd mogelijk te zijn (92). Wel lijkt het erop dat het veronderstelde gunstige milieu van de tuba voor de embryonale ontwikkeling bij ZIFT met bewijs ondersteund wordt.

Zo lijkt het voornaamste bezwaar van GIFT en ZIFT niet zozeer een tegenvallend zwangerschapspercentage te zijn, maar eerder de gecompliceerde en kostbaardere procedure. Een makkelijk uitvoerbare atraumatische transvaginale tubaire transfer zou uit dit oogpunt dus wel zinvol zijn. Blastocysteplaatsing vormt, indien de embryonale ontwikkeling in vitro geoptimaliseerd kan worden, een realistisch alternatief. Door het aantal embryo's te reduceren kan het ontstaan van meerlingen gereduceerd worden terwijl door de hoge implantatiekans van blastocysten toch een goed zwangerschapspercentage kan worden bereikt.

In de laatste jaren is er geen doorbraak van nieuwe technologie in de tubaire plaatsingstechniek geweest. Er zijn geen nieuwe systemen voor tubacatheterisatie ontwikkeld die voldoen aan de eisen minimaal/geen trauma, eenvoudige applicatie en acceptabele kosten. In een recente studie van Porcu (52), waarbij GIFT (n=25) transcervicaal per intratubaire catheter met een verbeterd systeem plaatsvindt, onder laparoscopische controle, wordt geen vergelijkend onderzoek met IVF-ET uitgevoerd. Het zwangerschapspercentage per GIFT was 28%, de implantatie per oöcyt was niet te berekenen. Kumar (53) vergeleek plaatsing van embryo's in de tuba of intra-uterien in de natuurlijke cyclus. De resultaten in beide groepen waren niet verschillend. Het interessante van deze studie is de implantatiekans (15,8%) van embryo's ontstaan zonder exogene stimulatie.

Verdere research op het gebied van kweekmedia, beheersing van het kweekproces, metabole processen, preimplantatiediagnostiek en voorzichtige plaatsing zal leiden tot optimalisering van IVF-resultaten.

Tabel V. Afweging voor- en nadelen van laparoscopische en transvaginale intratubaire plaatsingstechnieken.

<i>Voor- en nadelen techniek</i>	<i>Laparoscopisch</i>	<i>ZIFT</i>	<i>Transvaginale transfer</i>		<i>TET</i>
	<i>GIFT</i>		<i>GIFT</i>	<i>ZIFT</i>	
Milieu/synchronisatie	+	+	+	+	-
Herstel na ontdooing		+			
Z.P. verharding	+		?		
Bevruchting	+	+	+	+	±
Embryo selectie	-	-	-	-	± - +
Atraumatisch	+	+	-	-	-
Diagnostiek/therapie optie	+	+	-	-	-
Noodzaak vaardigheid	±	±	+	+	+
Narcose	+	+	-	-	-
Duur procedure	-	-	+	+	+
Logistiek	-	-	+	+	+
Kosten	-	-	±	±	±

Tabel VI. Retrospectieve studie t.a.v. intra tubaire transfer van zygoten en intra-uteriene plaatsing van blastocysten.

(Menezo 1996)

	<i>ZIFT</i>	<i>IVF-ET met blastocyst</i>
N transfer	137	217
Doorgaande zwangerschap	39	61
% zwanger per ET	28	28
% implantatie per 2PN/embryo	13	19
% meerlingen	23	41

Referenties

1. Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD. Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 1978;132:629-34.
2. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc* 1890;48:457-8.
3. Bittner JJ, Little CC. The transmission of breast and lung cancer in mice. *J of Heredity* 1937;28:117-21.
4. Noyes WN, Dickmann Z. Survival of ova transferred into the oviduct of the rat. *Fertil Steril* 1961;12:67-79.
5. Beyer G, Zeilmaker GH. Development of mouse and rat zygotes following transfer to non-synchronized rat and mouse oviducts. *J Reprod Fertil* 1973;33:141-143.
6. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976;1:880-2.
7. Lawson RAS, Adams CE, Rowson LEA. The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *Reprod Fertil* 1972;29:105.
8. Fisher DL, Smithberg M. Host-transplant relationship of cultured mouse embryos. *J Exp Zool* 1973;183:263-6.
9. Pampliglione JS, Bolton VN, Parsons JH, Campbell S. Gamete intra fallopian transfer combined with diagnostic laparoscopy: a treatment for fertility in a district hospital. *Hum Reprod* 1989;4:786-9.
10. Gindoff PR, Hall JL, Nelson LM, Stillman RJ. Efficacy of assisted reproductive technology during diagnostic and operative infertility laparoscopy. *Obstet Gynecol* 1990;75:299-301.
11. Johns DA. Clomiphene citrate-induced gamete intrafallopian transfer with diagnostic and operative laparoscopy. *Fertil Steril* 1991;56:311-3.
12. Trounson AO, Wood C. IVF and related technology. The present and the future. *Med J Aust* 1993;158:853-7.
13. Asch RH, Ellsworth LR, Balmaceda JP, Wong PC. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* 1984;2:1034-5.
14. Tournaye H, Camus M, Khan I, Staessen C, Van-Steirteghem AC, Devroey P. In-vitro fertilization, gamete- or zygote intra-fallopian transfer for the treatment of male infertility. *Hum Reprod* 1991;6:263-6.

15. Shettles LB. Ova harvest with in vivo fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1979;133:845.
16. Tesarik J, Pilka L, Dvorak M, Travník P. Oocyte recovery, in vitro insemination, and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. *Fertil Steril* 1983;39:472-75.
17. Seracchioli R, Bafaro G, Bianchi L, Borini A, Cattoli M, Maccolini A, Violini F, Tirelli S, Flamigni C. Influence of spermatozoa characteristics on gamete intra-fallopian transfer procedures: analysis of results obtained utilizing normozoospermic, oligoasthenozoospermic and donor spermatozoa. *Hum Reprod* 1993;8:2098-101.
18. Seracchioli R, Maccolini A, Porcu E, Ciotti P, Cattoli M, Fabbri R, Flamigni C. A new approach to gamete intra-fallopian transfer via hysteroscopy. *Hum Reprod* 1993; 8:2093-5.
19. Seracchioli R, Maccolini A, Porcu E, Borini A, Cattoli M, Ciotti P, Violini F, Flamigni C. The role of gamete intrafallopian transfer (GIFT) and tubal embryo transfer (TET) in the treatment of patients with patent tubes associated with male infertility factor. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:266-70.
20. Seracchioli R, Porcu E, Ciotti P, Fabbri R, Colombi C, Flamigni C. Gamete intrafallopian transfer: prospective randomized comparison between hysteroscopic and laparoscopic transfer techniques. *Fertil Steril* 1995;64:355-9.
21. Yovich JL, Yovich JM, Edirisinghe WR. The relative chance of pregnancy following tubal or uterine transfer procedures. *Fertil Steril* 1988;49:858-64.
22. Hammitt DG, Syrop CH, Hahn SJ, Walker DL, Butkowski CR, Donovan JF. Comparison of concurrent pregnancy rates for in-vitro fertilization--embryo transfer, pronuclear stage embryo transfer and gamete intra-fallopian transfer. *Hum Reprod* 1990;5:947-54.
23. Bollen N, Camus M, Staessen C, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC. The incidence of multiple pregnancy after in vitro fertilization and embryo transfer, gamete, or zygote intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 1991;55:314-8.
24. Mills MS, Eddowes HA, Cahill DJ, Fahy UM, Abuzeid MI, McDermott A, Hull MG. A prospective controlled study of in-vitro fertilization, gamete intra-fallopian transfer and intrauterine insemination combined with superovulation. *Hum-Reprod* 1992 ;7:490-4.
25. Leeton J, Rogers P, Caro C, Healy D, Yates C. A controlled study between the use of gamete intrafallopian transfer (GIFT) and in vitro fertilization and embryo transfer in the management of idiopathic and male infertility. *Fertil Steril* 1987;48:605-7.

26. Tanbo T, Dale PO, Abyholm T. Assisted fertilization in infertile women with patent fallopian tubes. A comparison of in-vitro fertilization, gamete intra-fallopian transfer and tubal embryo stage transfer. *Hum Reprod* 1990;5:266-70.
27. Crosignani PG, Walters DE, Soliani A. The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report. European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 1991;6:953-8.
28. Craft I, Al-Shawaf T. IVF versus GIFT. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:424-7.
29. Balmaceda JP, Gastaldi C, Remohi J, Borrero C, Ord T, Asch RH. Tubal embryo transfer as a treatment for infertility due to male factor. *Fertil Steril* 1988;50:476-9.
30. Balmaceda JP, Alam V, Roszjtein D, Ord T, Snell K, Asch RH. Embryo implantation rates in oocyte donation: a prospective comparison of tubal versus uterine transfers. *Fertil Steril* 1992;57:362-5.
31. Devroey P, Staessen C, Camus M, De Grauwe E, Wisanto A, Van Steirteghem AC. Zygote intrafallopian transfer as a successful treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1989;52:246-9.
32. Pool TB, Ellsworth LR, Garza JR, Martin JE, Miller SS, Atiee SH. Zygote intrafallopian transfer as a treatment for nontubal infertility: a 2-year study. *Fertil Steril* 1990;54:482-8.
33. Asch RH. Uterine versus tubal embryo transfer in the human. Comparative analysis of implantation, pregnancy, and live -birth rates. *Ann N Y Acad Sci* 1991;626:461-6.
34. Tournaye H, Devroey P, Camus M, Valkenburg M, Bollen N, Van-Steirteghem AC. Zygote intrafallopian transfer or in vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of male-factor infertility: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 1992;58:344-50.
35. Fluker MR, Zouves CG, Bebbington MW. A prospective randomized comparison of zygote intrafallopian transfer and in vitro fertilization-embryo transfer for nontubal factor infertility. *Fertil Steril* 1993;60:515-9.
36. Menezo YJR, Janny L. Is there a rationale for tubal transfer in human ART. *Human Reprod* 1996;11:1818-20.
37. Levran D, Mashiach S, Dor J, Levron J, Farhi J. Zygote intrafallopian transfer may improve pregnancy rate in patients with repeated failure of implantation. *Fertil Steril* 1998;69:26-30.

38. Jansen RP, Anderson JC. Catheterisation of the fallopian tubes from the vagina. *Lancet* 1987;2:309-10
39. Jansen RP, Anderson JC, Radonic I, Smit J, Sutherland PD. Pregnancies after ultrasound-guided fallopian insemination with cryostored donor semen. *Fertil Steril* 1988;49:920-2.
40. Jansen RP, Anderson JC, Sutherland PD. Nonoperative embryo transfer to the fallopian tube. *N Engl J Med* 1988;319:288-91.
41. Confino E, Friberg J, Gleicher N. Transcervical balloon tuboplasty. *Fertil Steril* 1986;46:963-6.
42. Thurmond AS, Rosch J, Patton PE, Burry KA, Novy M. Fluoroscopic transcervical fallopian tube catheterization for diagnosis and treatment of female infertility caused by tubal obstruction. *Radiographics* 1988;8:621-40.
43. Novy MJ, Thurmond AS, Patton P, Uchida BT, Rosch J. Diagnosis of cornual obstruction by transcervical fallopian tube cannulation. *Fertil Steril* 1988;50:434-40.
44. Scholtes MC, Roozenburg BJ, Alberda AT, Zeilmaker GH. Transcervical intrafallopian transfer of zygotes. *Fertil Steril* 1990;54:283-6.
45. Risque F, Boyer P, Rolet F, Magnani M, Guichard A, Cedard L, Zorn JR. Retrograde tubal transfer of human embryos. *Hum Reprod* 1990;5:185-8.
46. Yovich JL, Draper RR, Turner SR, Cummins JM. Transcervical tubal embryo-stage transfer (TC-TEST). *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990;7:137-40.
47. Diedrich K, Bauer O, Werner A, van der Ven H, al Hasani S, Krebs D. Transvaginal intra-tubal embryo transfer: a new treatment of male infertility. *Hum Reprod* 1991;6:672-5.
48. Ferraiolo A, Croce S, Anserini P, Remorgida V, Lanera P, Capitanio GL, de Cecco L. 'Blind' transcervical transfer of gametes in the fallopian tube: a preliminary study. *Hum Reprod* 1991;6:537-40.
49. Possati G, Seracchioli R, Melega C, Pareschi A, Maccolini A, Flamigni C. Gamete intrafallopian transfer by hysteroscopy as an alternative treatment for infertility. *Fertil Steril* 1991;56:496-9.
50. Jansen RP, Anderson JC. Transvaginal versus laparoscopic gamete intrafallopian transfer: a case-controlled retrospective comparison. *Fertil Steril* 1993;59:836-40.
51. Scholtes MCW, Roozenburg BJ, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A randomized study of transcervical intrafallopian transfer of pronucleate embryos controlled by ultrasound versus intrauterine transfer of four- to eight-cell embryos. *Fertil-Steril* 1994;61:102-4.

52. Porcu E, Dal Prato L, Seracchioli R, Petracchi S, Fabbri R, Flamigni C. Births after transcervical gamete intrafallopian transfer with a falloposcopic delivery system. *Fertil Steril* 1997;67:1175-7.
53. Kumar A, Benny P, Lenton EA, Cooke ID. Retrograde tubal embryo transfer in natural cycle in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:484-6.
54. Pearlstone AC, Surrey ES, Kerin JE. The linear everting catheter: a nonhysteroscopic, transvaginal technique for access and microendoscopy of the fallopian tube. *Fertil Steril* 1992;58:854-7.
55. Bauer O, Diedrich K, Bacich S, Knight C, Lowery G, van der Ven H, Werner A, Krebs D. Transcervical access and intra-luminal imaging of the fallopian tube in the non-anaesthetized patient; preliminary results using a new technique for fallopian access. *Hum Reprod* 1992;7 Suppl 1:7-11.
56. Jansen RP. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol* 1980;136:292-308.
57. Blandau RJ. Gamete transport-comparative aspects. In *The Mammalian Oviduct*, Edited by ESE Hafez, RJ Blandau. Chicaco, University of Chicago Press, 1969, p129.
58. Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR, Wong PC. Gamete intra-fallopian transfer (GIFT): a new treatment for infertility. *Int J Fertil* 1985;30:41-5.
59. Devroey P, Braeckmans P, Smits J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem A, Heytens L, Camu F. Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1986;1:1329.
60. Bustillo M, Munabi AK, Schulman JD. Pregnancy after nonsurgical ultrasound-guided gamete intrafallopian transfer. *N Engl J Med* 1988;319:313.
61. Leerentveld RA, Janssen Caspers HA, van Os HC, Scholtes MC, Wladimiroff JW, Zeilmaker GH, de Jong FH, Alberda AT. The value and role of plasma 17 beta-oestradiol measurements during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1988;3:735-9.
62. Quigley MM, Sokoloski JE, Withers DM, Richards SI, Reis JM. Simultaneous in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Fertil Steril* 1987;47:797-801.
63. Balmaceda JP, Remohi J, Gerli S, Ord T, Asch RH. Embryo implantation rates: comparison of tubal versus embryo or oocyte transfers (Abstr). Presented at the Sixth World Congress on in vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Jeruzalem, Israel, April 2 to 7, 1989, p86.

64. Hunter RH. Human fertilization in vivo, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Hum Reprod* 1987;2:329-32.
65. Sulak PJ, Letterie GS, Coddington CC, Hayslip CC, Woodward JE, Klein TA. Histology of proximal tubal occlusion. *Fertil Steril* 1987;48:437-40.
66. Yovich JL, Blackledge DG, Richardson PA, Matson PL, Turner SR, Draper R. Pregnancies following pronuclear stage tubal transfer. *Fertil Steril* 1987;48:851-7.
67. Hamori M, Stuckensen JA, Rumpf D, Kniewald T, Kniewald A, Marquez MA. Zygote intrafallopian transfer (ZIFT): evaluation of 42 cases. *Fertil Steril* 1988;50:519-21.
68. Marston JH, Penn R, Siville PC. Successful autotransfer of tubal eggs in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Reprod Fertil* 1977;49:175-6.
69. Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987;81:23-8.
70. Papaioannou VE, Ebert KM. Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J Reprod Fertil* 1986;76:603-8.
71. Borland RM, Biggers JD, Lechene CP, Taymor ML. Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1980;58:479-82.
72. Wu CH, Mastroianni L Jr, Mikhail G. Steroid hormones in monkey oviductal fluid. *Fertil Steril* 1977;28:1250-6.
73. Brundin J. An occlusive mechanism in the fallopian tube of the rabbit. *Acta Physiol Scand* 1964;61:219.
74. Khatchadourian C, Menezo Y, Gerard M, Thibault C. Catecholamines within the rabbit oviduct at fertilization time. *Hum Reprod* 1987;2:1-5.
75. Jansen RP. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr Rev* 1984 Fall; 5: 525-51.
76. van Os HC, Alberda ATh, Janssen-Caspers HAB, Leerentveld RA, Scholtes MCW, Zeilmaker GH. The influence of the interval between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome. *Fertil Steril* 1989;51:360-2.
77. Guzick DS, Balmaceda JP, Ord T, Asch RH. The importance of egg and sperm factors in predicting the likelihood of pregnancy from gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 1989;52:795-800.
78. Jansen CAM, Van Beek JJ, Verhoeff A, Alberda ATh, Zeilmaker GH. In-vitro fertilization and embryo transfer with transport of oocytes. *Lancet* 1986;1:676.
79. Zeilmaker GH. The laboratory procedure of in-vitro fertilization: some observations and

- conclusions. In: Nunez J, Dumont JE, King RJB, Editors. Colloque Inserm: hormones and cell regulation. London, Paris: J. Libby, 1986;139:43-9.
80. Scholtes MC, Wladimiroff JW, van Rijen HJ, Hop WC. Uterine and ovarian flow velocity waveforms in the normal menstrual cycle: a transvaginal Doppler study. *Fertil Steril* 1989;52:981-5.
 81. Borrero C, Ord T, Balmaceda JP, Rojas FJ, Asch RH. The GIFT experience: an evaluation of the outcome of 115 cases. *Hum Reprod* 1988;3:227-30.
 82. Palermo G, Devroey P, Camus M, De Grauwe E, Khan I, Staessen C, Wisanto A, Van Steirteghem AC. Zygote intra-fallopian transfer as an alternative treatment for male infertility. *Hum Reprod* 1989;4:412-5.
 83. Cohen J. Assisted hatching: indications and techniques. *Acta Eur Fertil* 1993;24:215-9.
 84. Levran D, Dor J, Rudak E, Nebel L, Ben-Shlomo I, Ben-Rafael Z, Mashiach S. Pregnancy potential of human oocytes--the effect of cryopreservation. *N Engl J Med* 1990;323:1153-6.
 85. Van Voorhis BJ, Syrop CH, Vincent RD Jr, Chestnut DH, Sparks AE, Chapler FK. Tubal versus uterine transfer of cryopreserved embryos: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 1995;63:578-83.
 86. Trounson AO, Wood C. IVF and related technology. The present and the future. *Med J Aust* 1993;158:853-7.
 87. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1993 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 1995;64:13-21.
 88. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:1245-48.
 89. Menezo YJ, Sakkas D, Janny L. Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc Res Tech* 1995;32:50-6.
 90. Janny L, Vye P, Pouly JL, Hazout A, Dumont M, Nicoliet B, Menezo Y. Cocultures: diagnostic and therapeutic value. *Contracept Fertil Sex* 1993;21:391-4.
 91. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 1992;Suppl 1:101-6.
 92. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. Blastocyst transfer in day 5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil Steril* 1998;69:78-83.

93. Tournaye H, Camus M, Ubaldi F, Clasen K, Van Steirteghem A, Devroey P. Tubal Transfer: A forgotten art? Is there still an important role for tubal transfer procedures? Human Reprod 1996;11:1815-22.

HOOFDSTUK III

IVF en de intra-uteriene plaatsing van blastocysten

DEEL 1

Inleiding

Hoewel de aandacht voor het intra-uterien plaatsen van blastocysten na in-vitro-fertilisatie toeneemt, wordt over het algemeen niet afgewacht tot het blastocyste stadium is bereikt, maar worden al na een kweekduur van 2-3 dagen de ontstane embryo's in de uterus holte gebracht. Het implantatiepercentage per embryo varieert tussen 10-20% (1,2).

Menselijke embryo's die normaal pas na compactie in het cavum uteri aankomen, kunnen bij eerdere plaatsing mogelijk een suboptimale embryonale ontwikkeling doormaken, zoals beschreven voor de rat door Noyes in 1961 (3).

Synchronisatie tussen ontwikkelingsstadium van het embryo en endometrium is een belangrijk punt bij het besluit om over te gaan tot plaatsing van blastocysten.

Een korte beschrijving van de menselijke preïmplantatieontwikkeling en de daarbij relevante factoren wordt gegeven. Vervolgens wordt ingegaan op fysiologische aspecten van cellkweek-technieken.

Embryonale preïmplantatie-ontwikkeling

- *Bevruchting*

Bij de klassieke IVF wordt in tegenstelling tot de ICSI een groot aantal zaadcellen in de kweekdruppel aangebracht waarin zich reeds één of meer eicel-cumulus complexen bevinden. Na het passeren van de cumulus volgt het hechten van zaadcellen aan de zona pellucida en vervolgens het penetreren van de zona, dat ongeveer 1 uur na inseminatie van de kweekdruppel optreedt. De eigenlijke penetratie van de zona duurt ongeveer 6 minuten.

De volgende stap betreft de penetratie van het oölemma, de vorming van mannelijke en vrouwelijke voorkernen en de uitstoting van het tweede poollichaampje.

De vorming van de mannelijke en vrouwelijke voorkernen vindt plaats door decondensatie van de respectievelijke chromosomen en is na ongeveer 16 uur voltooid. In dit stadium wordt er van een zygote gesproken. In de daaropvolgende stappen, waaronder in veel publicaties de “bevruchting” wordt verstaan, nemen de chromosomen plaats in het metafasevlak en volgt de eerste mitotische deling na 21-23 uur. De voornoemde gebeurtenissen kunnen bij ICSI iets sneller verlopen, immers hier wordt gericht en direct een zaadcel in het cytoplasma van de eicel ingebracht.

- Precompactie fase 24-84 uur na inseminatie

De eerste celdeling is reeds enkele uren na het vaststellen van voorkernen zichtbaar. Er bestaan een aantal theorieën/modellen betreffende de wijze en oorzaak van differentiatie van de blastomeren van het embryo tot één van de cellijnen die de foetus vormen. Uiteraard zijn vele observaties afkomstig uit dierexperimenteel onderzoek en derhalve niet automatisch van toepassing op de humane embryonale ontwikkeling. Verder is het uit ethisch oogpunt niet waarschijnlijk dat er onderzoek met menselijke embryo's, uitsluitend voor researchdoeleinden gekweekt, mogelijk zal zijn. Het exacte mechanisme van de differentiatie van 2-cellige embryo's tot blastocyste is tenminste momenteel nog deels hypothetisch en afgeleid uit studies voortkomend uit IVF en geëxtrapoleerd uit waarnemingen van andere species. Verder blijkt uit de hieronder besproken invloed van de celkweekmethode op de embryonale ontwikkeling dat waarnemingen met voorzichtigheid geïnterpreteerd moeten worden.

De regulering van de eerste klievingsdelingen berust hoofdzakelijk op maternale transcripten uit het embryo. Naar algemeen wordt aangenomen, wordt het embryonale genoom pas na het 4-cellig stadium geactiveerd (4). Bij de mens werd de expressie van het hCG-gen in 6-8 cellige embryo's beschreven (5), bij de muis zijn er aanwijzingen voor een vroegere expressie van TGF- β (6), hxt (7), en het ped (8) gen.

Uit dierexperimenteel onderzoek blijkt dat vroege blastomeren zowel tot totipotentie kunnen terugkeren (9), en dat bij de muis vanaf het 4-8 cellige stadium de totipotentie afneemt (10). Totipotentie hoeft niet direct een alles of niets fenomeen en voor alle blastomeren in gelijke mate aanwezig te zijn en stelt daardoor grenzen aan het regeneratie vermogen (11,12). Met het beginnen van transcriptie vermindert totipotentie.

Het is bekend uit de preïmplantatiediagnostiek dat het verwijderen van teveel blastomeren uit een embryo tot een kleine embryoblast leidt (13,14,15). Slechte IVF resultaten zouden verklaard kunnen worden door verlies van blastomeren (fragmentatie), als gevolg van een suboptimale embryonale ontwikkeling door een deficiënte celkweek.

- Compactie tot implantatie: Morula tot "hatching" blastocyst

Bij menselijke embryonen begint holtevorming tussen de 4e en 5e deling. Men neemt aan dat vanaf dit stadium de facto differentiatie plaatsvindt. De morula is na 84-96 uur ontwikkeld, waarna het embryo zich door holtevorming (cavitatie) in een blastocyste transformeert.

Laat op dag 4 na inseminatie worden voor het eerst blastocysten aangetroffen; geëxpandeerde blastocysten hebben ongeveer 130 cellen (16).

Uit onze waarnemingen werd duidelijk dat de embryonale ontwikkeling op dag 5 een vrij grote variatie laat zien wat betreft het ontwikkelingsstadium in één en dezelfde kweekdruppel. Het stadium van celdeling op dag 5 strekt zich uit van embryo's met een precompactie stadium via 8-12 cellige stadia, morula, overgangsstadia morula-blastocyste, -waarbij de aanzet tot structurele opbouw van de blastocyste gezien wordt, maar geen duidelijke holtevorming-, via blastocyste tot "hatching" blastocyste.

Bij de blastocyste is een duidelijke onderverdeling in trofoblast en "inner cell mass" (embryo-blast) zichtbaar. De kiemcellijn is bij preïmplantatie-embryonen nog niet te onderscheiden, het exacte tijdstip van ontstaan en origine van de kiemcellijn is omstreken.

Hatching van een blastocyste is het in-vitro geobserveerde vrijkomen van de blastocyste uit de zona pellucida. De zo vrijgekomen blastocyste bevindt zich dan in de uterus holte tot het moment van implantatie. Er zijn redenen om zich af te vragen of in vitro hatching niet een artefact is. Muizenembryo's hatchen alleen in vitro, en niet in vivo tijdens een normale zwangerschap. De zona pellucida wordt dan enzymatisch opgelost.

De trofoblastcellen die over de embryoblast liggen transformeren zich tot trofoblastweefsel en hechten zich aan uterus epitheel en vernietigen dit plaatselijk, het eigenlijke innestelingsproces. Hiermee is de preïmplantatie periode afgesloten. Bij de muis duurt deze preïmplantatieperiode ongeveer 4 dagen, bij de mens 1-2 dagen langer.

Al 3-4 dagen postcoitum worden bij de muis blastocysten aangetroffen, de variatie in ontwikkeling is minder groot dan bij de humane IVF (17).

Bij de muis (17) en bij de mens (18) is de snelheid van de celcyclus verschillend in de afzonderlijke cellijnen van de blastocyste. De groeisnelheid van de trofoblast (celcyclus 6h) ligt tijdelijk hoger dan van de embryoblast (celcyclus 24h).

De differentiatie van embryoblast en trofoblast wordt vermoedelijk door aparte genen geregeld (19,20).

Groeivertraging en ontwikkelingsstop

De groeisnelheid van embryo's kan beïnvloed worden door (milieu)omstandigheden tijdens de kweek (21). Een andere oorzaak voor een stoornis in de groeisnelheid kunnen genetische factoren zijn. Chromosomale oorzaken (22,23,24) voor verminderde groeisnelheid c.q. ontwikkelingsstop zijn terug te voeren op aneuploidie, mosaïcisme, of eliminatie van blastomeren door celcyclus regulerende genen zoals p53, Gadd45, Bcl-xL (25,26,27,28). Desondanks ontsnappen waarschijnlijk niet-diploïde meerkernige/gefragmenteerde cellen aan eliminatie in de embryoblast of trofoblast (13,29,30). Fragmentatie of apoptose (geprogrammeerde celdood) in een cellijn (31) hoeft niet lethaal te zijn voor een embryo zolang er voldoende diploïde blastomeren overblijven.

Apoptose is een proces dat een reguliere functie in de ontogenese (32) heeft, maar ook bij suboptimale kweekomstandigheden voorkomt (33). De apoptose veroorzaakt in wisselende mate eliminatie van abnormale cellen (23) of cellen met een afwijkend ontwikkelingspotentieel (34).

Abnormale cellen kunnen in de perivitelline ruimte worden afgestoten, verloren gaan bij de "hatching" van de blastocyste (18,35) of zouden bij voorkeur deel kunnen gaan uitmaken van de trofoblast (36).

Implantatie van morfologisch afwijkende embryo's met weinig normale blastomeren lijkt echter niet goed mogelijk (37). Deze observaties worden ondersteund door dierproeven van Devreker en Hardy (21). Bij muizenblastocysten met < 50 cellen is het percentage apoptose relatief hoog in tegenstelling tot bij celrijkere blastocysten. De incidentie van celdood lijkt gecorreleerd te zijn met embryokwaliteit zoals Hardy aantoonde (18). Bij dag-6 muizen-embryo's met goede morfologie werd in <10% van de celpopulatie celdood gezien, in embryo's met een slechte morfologie tot 27%.

Tabel I geeft die gevallen weer waarbij door totale fragmentatie of degeneratie van het embryo op dag 3 of dag 5 of een ontoereikende embryonale ontwikkeling (< 8 cellig op dag 5) geen embrioplaatsing mogelijk was. (ongepubliceerd retrospectief materiaal IVF centrum Düsseldorf)

Tabel I. Embryo-ontwikkelingsstop bij patiënten gepland voor ET op dag 3 of dag 5 na de eicelpunctie bij cycli met bevruchting

<i>Geplande dag ET</i>	<i>N cycli</i>	<i>N ET</i>	<i>N ontwikkelingsstop(%)</i>
3	1309	1252	57(4,3)*
5	610	567	43(7)*

* *Chi kwadraat niet significant.*

Fysiologische aspecten van preïmplantatie-embryo's

Fysiologisch dient een verschil gemaakt te worden tussen pre- en postcompactie embryo's, waarmee ook bij de samenstelling van media voor embriyokweek en de regulering van de kweekomstandigheden rekening moet worden gehouden.

Bij precompactie-embryo's vindt weinig biosynthese plaats (38), bestaat een geringe respiratoire activiteit (39,40,41) en een beperkte capaciteit om glucose als energiebron te gebruiken (42,43,44, 45,46,47,48), namelijk slechts vanaf het 8-cellig stadium. In jongere stadia wordt pyruvaat of oxaalazijnzuur verbrand.

Bij postcompactie-embryo's, na genoomactivatie (4,49), komt de eiwitsynthese op gang gepaard gaande met de daarvoor benodigde respiratoire activiteit en energieconsumptie. In de energiebehoefte van het embryo wordt vanuit verschillende bronnen voorzien afhankelijk van de ontwikkelingsfase van het embryo.

Vóór het morulastadium zijn de blastomeren nog niet met elkaar vast verbonden en hebben nog geen regelmechanisme zoals in een groot celverband aanwezig is. Tijdens compactie van het embryo ontstaat het eerste transportepitheel (50), waardoor gradiënten door het embryo actief gereguleerd kunnen worden.

Componenten die van belang kunnen zijn bij blastocystevorming zijn onder andere: strikte regulering van temperatuur, CO₂, O₂, kweekduur, species, stam en mediumsamenstelling. Een hoog percentage blastocystevorming betekent niet automatisch optimale implantatie (51).

Het belang dat toegekend wordt aan het kweekmedium voor het goed functioneren van in-vitro-fertilisatie en de fysiologische aspecten die hierin een rol spelen wordt beschreven in overzichtsartikelen van Bavister (52) en Gardner (53).

Mediumsamenstelling

De in de humane IVF gebruikte media zijn in 2 soorten te onderscheiden (54): eenvoudige en complexe media.

De eenvoudige media (Earl's, T6, HTF) zijn gebaseerd op gebalanceerde zoutoplossingen met pyruvaat, lactaat en glucose. Het doel van complexere samenstelling van media zoals Ham F-10 is om zoveel mogelijk nutriënten aan te bieden voor de embryonale ontwikkeling (55). Daartoe worden in wisselende samenstelling aminozuren, vitaminen, glutamine, chelators, serum, albumine of plasma toegevoegd.

De wisselende positie in de tractus genitalis en de mogelijk veranderende behoeften van het preïmplantatie-embryo wordt hierbij niet gerespecteerd. Daarom wordt ook wel meer dan één mediumsoort tijdens de IVF-kweek gebruikt (56).

Bij de humane IVF, waar de kweekduur vaak tot 2-3 dagen beperkt wordt, is de meeste informatie over het effect van media beperkt tot uitspraken over de precompactie fase van het embryo.

Co-cultuur ter ondersteuning van de IVF-kweek

Het nabootsen van de situatie in de tuba is de achtergrond voor de poging om kweekomstandigheden te verbeteren. De gangbare media laten vaak een ontwikkelingsstop zien, vooral bij het bereiken van het compactiestadium.

De techniek van co-cultuur werd in 1984 geïntroduceerd door Allen en Wright (57) en door Gandolfi (58) in 1987. Deze techniek beoogt het gelijktijdig of achtereenvolgens kweken van embryo's met een andere cellijn in hetzelfde medium met als doel het ondersteunen van de embryonale ontwikkeling door de andere cellijn. Als mogelijk werkingsmechanisme van de co-cultuur worden in de eerste plaats embryotrofische factoren genoemd (59) zoals een glycoproteïne dat door het eileider epitheel geproduceerd wordt, groeifactoren, glycine en alanine (60,61,62).

Verder kan een invloed uitgaan op het metabolisme in de kweek door chelatie van zware metalen, reductie van de glucosespiegel door gebruik als energiebron door de co-cultuur, waardoor de lactaatspiegel stijgt en bovendien O₂ verbruikt wordt (63) en mogelijk een effect op de extracellulaire pH.

Een aantal factoren zijn van belang bij de beoordeling van co-cultuur. Ten eerste het type monolayer van de co-cultuur. Een cellijn zoals tuba-epitheel, endometriumcellen, granulosa-cellen, fibroblasten, apenniercellen (Vero) of levercellen van de Buffalorat kunnen gebruikt worden (58,64,65,66,67,68).

Er worden verschillende kweektijden aangegeven tussen 1-5 dagen. Dit is essentieel omdat pre- en postcompactie embryo's andere eisen aan hun omgeving stellen.

De eerste indruk van de resultaten van co-cultuur was positief (69,70,71,72,73,74).

Gezien het risico op transmissie van ziekteverwekkers zouden alleen Verocellen voor gebruik in co-cultuur in aanmerking komen, aangezien die reeds voor het voorbereiden van vaccins gebruikt worden. Een andere mogelijkheid zonder medisch risico is het gebruik van autologe granulosa-cellen (75).

Studies van Plachot (75,76,77) met een negatieve patiëntenselectie meldden dat met gebruik van Verocellen als co-cultuur winst zou zijn te boeken. Deze studies waren niet gecontroleerd, noch gerandomiseerd.

De conclusie is dat beoordeling van co-cultuurresultaten onmogelijk is door het ontbreken van voldoende valide studies.

Volgens Bavister (52,78) is het milieu bij co-cultuur wezenlijk afwijkend van dat in-vivo. Hij concludeert dat *"The need for co-culture in particular locations might thus be eliminated by placing very strict quality controls on the environment being provided by the culture incubator, which is notoriously variable"*.

Conclusies

Het is mogelijk blastocysten te plaatsen met een goede implantatiekans, ook zonder gebruikmaking van co-cultuur. Uit onze resultaten blijkt dat de implantatiekans van blastocysten op dag 5 significant hoger is dan van 8-cellige embryo's op dag 3. Dit wordt in een latere gerandomiseerde studie door Gardner et al. bevestigd (79).

Verdere optimalisering van kweekomstandigheden zullen leiden tot een verbeterde ontwikkeling tot blastocyste. Ontwikkelingsstoornissen tot blastocyste worden niet alleen veroorzaakt door uitwendige omstandigheden zoals kweektechniek maar ook bepaald door de genetische samenstelling van het embryo en de daaraan gerelateerde genoom activatie.

Voordelen voor het systematisch intra-uterien plaatsen van blastocysten zijn:

- synchronisatie; na een kweekduur van 2 of 3 dagen behoort het embryo nog in het tubaire milieu, blastocysten zijn in fase met het endometrium,
- bij andere zoogdieren wordt een slechte implantatie van intra-uterien geplaatste pre-compactie embryo's gezien (52),
- er zijn minder embryo's nodig vanwege een hogere natuurlijke implantatie (80),
- er vindt een natuurlijke selectie plaats naar pre-compactie- en compactie-embryo's, een ontwikkelingsstop is op dag 5 duidelijk herkenbaar,
- er kan op basis van morfologische criteria, biochemische parameters (81,82) onderscheid gemaakt worden tussen blastocysten,
- d.m.v. blastomerenbiopsie kan informatie voor preïmplantatiediagnostiek verkregen worden.

De nadelen van een langere kweekduur zijn:

- logistiek moeilijker, meer materiaal waardoor theoretisch meer kans op verwisseling, meer ruimte in de broedstoven nodig,
- langer kweken betekent tevens langer blootgesteld zijn aan onfysiologische omstandigheden en eventueel deficiënte media,

- een hogere psychische belasting van het paar door het optreden van een ontwikkelingsstop in-vitro, hoewel door de natuurlijke selectie kansloze embryoplaatsingen worden vermeden,
- indien een systeem met co-cultuur gebruikt wordt, de medische bezwaren daarvan,
- betekent niet automatisch een betere implantatie,
- cryopreservatie lukt minder goed.

Appendix

Indeling van embryo-ontwikkelingsstadia geobserveerd na een kweekduur van 5 dagen in medium zonder co-cultuur (zie Foto 1)

Precompactiestadium, alle klievingsstadia tot aan de morula

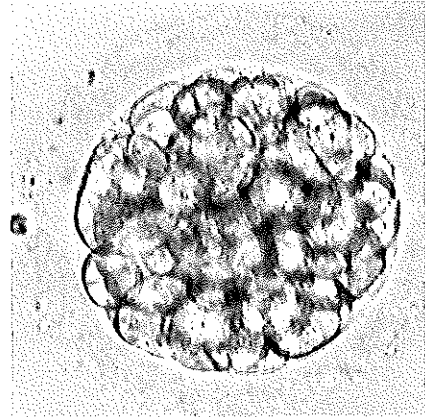
- Blastomeren van gelijke grootte of iets verschillend, geen anucleaire fragmenten,
- Blastomeren van gelijke grootte of iets verschillend, <20% anucleaire fragmenten,
- Blastomeren van gelijke grootte of iets verschillend, 20-50% anucleaire fragmenten,
- 50% of > anucleaire fragmenten.

Compactiestadium, van morula tot "gehatchte" blastocyste

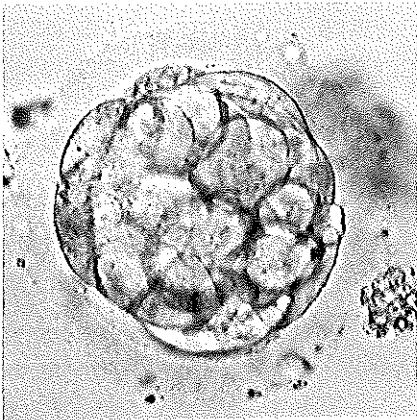
- Morula,
- Overgangsstadium morula - blastocyste, nog geen duidelijke cavitatie, sikkelcelachtige cellen perifeer zichtbaar,
- Vroege blastocyste, blastocoel zichtbaar, beginnende differentiering naar trofoblast en embryoblast, celrijk of celarm,
- Late blastocyste, volledige differentiëring naar trofoblast en embryoblast, expanderend tot volledig geëxpandeerd, celrijk of celarm,
- Totaal geëxpandeerde blastocyste, "hatching" of totaal uit de zona pellucida vrijgekomen.



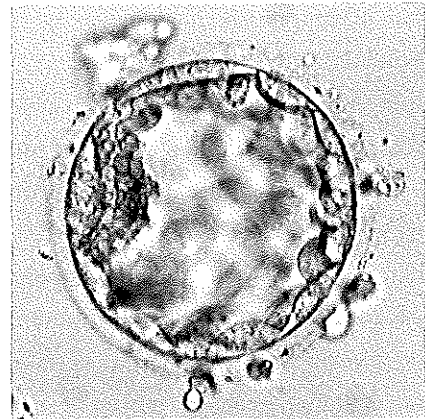
A



B



C



D

Foto 1: Embryonale ontwikkelingsstadia.

- A. 6-8 cellig stadium
- B. Morula
- C. Overgangsstadium morula-blastocyste
- D. Blastocyste met goed ontwikkelde embryoblast.

DEEL 2

Een prospectief gerandomiseerde studie over plaatsing van embryo's na IVF bij een kweekduur van drie of vijf dagen

(naar oorspronkelijk artikel Fertil Steril 1996;65:1245-8. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization.)

Samenvatting

Het doel van deze studie is het vergelijken van de implantatie van embryo's na een kweekduur van drie of vijf dagen. Prospectieve randomisatie werd bepaald door de weekdag dat de eicelpunctie plaatsvond. Het onderzoek werd uitgevoerd in het IVF centrum Düsseldorf. Het geanalyseerde materiaal betrof 233 plaatsingen op dag drie en 410 op dag vijf na de eicelpunctie.

Indien er blastocysten met een duidelijke embryoblast voor plaatsing in utero beschikbaar waren, werden maximaal twee blastocysten gebruikt.

Na een kweekduur van drie dagen werden 60 patiënten op 233 plaatsingen (26%) zwanger, na vijf dagen kweken 102 van de 410 plaatsingen (25%). Het gemiddelde implantatiepercentage per embryo bedroeg respectievelijk 13% en 12%.

Als morfologische criteria in aanmerking werden genomen, dan werd na drie dagen celkweek, bij plaatsing van ongefragmenteerde embryo's, een zwangerschapspercentage per transfer en implantatiepercentage per embryo van respectievelijk 23% en 18% (n=59) gevonden. Deze gegevens verschilden niet statistisch significant van embryo's met maximaal 20% fragmenten, met respectievelijk 27% zwangerschap per transfer en een implantatie per embryo van 12% (n=73).

Bij plaatsingen na vijf dagen celkweek, waren de resultaten als één of meer caviterende embryo's in utero geplaatst werden, respectievelijk 40% zwangerschap per ET en 23% implantatie per embryo, hetgeen statistisch significant hoger is dan de resultaten na plaatsing van morfologisch optimale tot maximaal 20% gefragmenteerde embryo's op dag drie.

De resultaten na plaatsing in utero op dag vijf van morula's en embryo's met vroege tekenen van beginnende blastulering waren 10% zwangerschap per ET en een implantatie van 6%

(n=69) per embryo. De resultaten van ET met embryo's die niet het morula stadium op dag vijf bereikten met respectievelijk 4% en 2% (n=114).

Er mag uit deze gegevens geconcludeerd worden dat de resultaten wat betreft zwangerschap en implantatie na drie en vijf dagen kweek gemiddeld niet verschillen. Na een kweekduur van vijf dagen is het echter mogelijk slechts 1-2 embryo's in utero te plaatsen met een gemiddelde implantatiekans per embryo van > 23%. Hierdoor verkleint de kans op het ontstaan van drielingen drastisch.

Inleiding

Het in utero plaatsen van embryo's na in-vitro-fertilisatie wordt in het algemeen na twee dagen gedaan, op het moment dat embryo's in het viercellig stadium verkeren. Veronderstelde onvolkomenheden in kweekomstandigheden leidden tot de mening dat de kweekduur in het laboratorium zo kort mogelijk diende te zijn. De resultaten van plaatsing op dag drie zijn minstens even goed als die na plaatsing op dag twee, hetgeen nieuwe logistieke voordelen biedt. Bovendien is het mogelijk op dag drie morfologisch goede embryo's te selecteren met een te verwachten goede embryonale ontwikkeling (1).

Huisman et al.(83) beschrijven dat een verlenging van de kweekduur tot vier dagen verdere selectie mogelijk maakt van caviterende morulae met een hoog implantatiepercentage. Oliivnnes et al.(84) meldden dat de plaatsing in utero van blastocysten, ontstaan na co-cultuur met de niercellen van Afrikaanse groene apen (Vero cellen), tevens leidde tot een hoog implantatiepercentage.

Nu het technisch mogelijk is met behulp van een betrouwbaar, geoptimaliseerd kweekstelsel embryo's langer te kweken, ligt het voor de hand de klinische effecten van een kweekduur van vijf dagen te onderzoeken.

In deze prospectief gerandomiseerde studie werd het implantatiepercentage per embryo in verschillende stadia van ontwikkeling onderzocht, na een kweekduur van drie en vijf dagen, in een kweekstelsel met ultrasnelle CO₂ compensatie in de broedstoven en zonder gebruik te maken van co-cultuur technieken.

Het plaatsen van een beperkt aantal embryo's met een hoog implantatiepercentage wordt besproken in het kader van meerlingzwangerschappen en de individuele kans om zwanger te worden.

Materiaal en methoden

In de periode juli - december 1994 werden de patiënten uit het IVF programma waarbij een plaatsing mogelijk was, afhankelijk van de weekdag waarop de eicelpunctie gedaan werd, gerandomiseerd voor plaatsing op dag drie of vijf.

Op dag drie werden 233 plaatsingen gedaan, 410 op dag vijf na de eicelpunctie.

Het stimulatieprotocol bestond uit een lang werkend GnRH analoog, 200µg nafareline-aceetaat intranasaal tweemaal per dag vanaf de mid-luteale fase in de cyclus voorafgaand aan de behandelingscyclus. Nadat echoscopisch vastgesteld was dat de ovariële suppressie met het GnRH analoog voldoende was, werd ten vroegste op dag 3 van de cyclus gestart met hMG of FSH in een dosering van 150 IU/d hetzij intramusculair of subcutaan. Eventuele individuele aanpassingen qua dosering vonden plaats op geleide van de gegevens uit eerdere stimulaties. De toediening van hCG, 10.000 IU I.M., vond plaats als 2 of meer dominante follikels van minimaal 18 mm diameter gezien werden. De toediening van het GnRH analoog werd gestopt op het moment dat hCG gespoten werd. Een transvaginale echoscopisch geleide eicelpunctie werd 35 uur na de hCG-injectie uitgevoerd.

De luteale suppletie bestond uit 600 mg gemicroniseerde progesteron vaginaal in combinatie met 1500 IU hCG op dag 2, 5 en 8 na de eicelpunctie, tenzij symptomen van een dreigende overstimulatie aanwezig waren.

In het IVF-laboratorium werden de eicellen in een druppel kweekmedium verzameld onder minerale olie (Repromed, International Medical CY. POB, 7200 AC Zutphen, Nederland). Het kweekmedium (zie Tabel I) bestond uit een mengsel van Earle's en Ham's F10 zonder toevoeging van hypoxantine en thymidine en 8,8 % gepasteuriseerde plasma-eiwit oplossing (GPO, Bloedbank Nederlandse Rode Kruis, Amsterdam, Nederland) (85), bestaande uit alle serumeiwitten verkregen van gescreend en gepasteuriseerd donorbloed.

Tabel 1. Samenstelling IVF-kweekmedium

NaCl	5,499g
KCl	0,336g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,173g
NaHCO ₃	2,096g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,135g
Glucose	0,846g
Na-pyruvate	0,020g
Ca-L-lactaat(Fluka cat#21185)	0,577g
Ham F 10(Gibco cat#07490073T)	1,731g
Penicillin	5000mU
Streptomycin	5 mg
GPO	88,0 ml

Samenstelling kweekmedium voor het aanmaken van 1 L met Analar water, BDH Laboratory supplies, Poole, UK. (Zeilmaker's medium).

De strikte controle van de broedstoven verliep met gebruikmaking van externe apparatuur: een kwikthermometer in een fles met de minerale olie, temperatuur 36,8°C; CO₂ metingen door een gecalibreerde capnograaf (Datex CD 200, Helsinki, Finland) en een CO₂ controller. Het laatstgenoemde apparaat verbindt de capnograaf met de CO₂-kleppen van de broedstoven gedurende de tijd dat gewerkt wordt, met als gevolg een infrarood-gecontroleerd herstel van de partiële CO₂ spanning binnen 3 minuten na het openen van de deur van de broedstoof. Zonder de CO₂ controller neemt dit herstel proces ongeveer 20 minuten in beslag. De positieve invloed op IVF resultaten van dit regelsysteem werd reeds eerder vermeld (86).

De embryo's werden tussen de inspectie van de pronucleï en de plaatsing niet uit de broedstoof gehaald. De classificatie van embryo's op dag 3 na de eicelpunctie gebeurde aan de hand van de fragmentatiegraad en de regelmatige vorm van de blastomeren.

Perfekte embryo's waren zonder fragmenten met strikt identieke normale blastomeren, goede embryo's hadden maximaal 20% fragmentatie en/of een onregelmatige vorm van de blastomeren (zie Foto 1).

De ontwikkeling van de embryo's na een kweekduur van 5 dagen liep uiteen. De teruggeplaatste embryo's varieerden van 8-32-cellig stadium, morula, morula - blastula stadium: perifere formatie van sikkelachtige cellen nog zonder duidelijke blastocoelvorming en cavite-

rende embryo's: vroege blastocysten met of zonder een duidelijke embryoblast tot expanderende blastocysten met en zonder een normale hoeveelheid embryoblast.

Op dag drie na de eicelpunctie werden maximaal 3 embryo's teruggeplaatst, na een kweekduur van vijf dagen werd het maximale aantal tot 2 teruggebracht onder voorwaarde dat twee expanderende blastocysten met een duidelijk aanwezige embryoblast voor de plaatsing beschikbaar waren. In de andere gevallen werd op dag vijf met de patiënten het aantal terug te plaatsen embryo's individueel afgesproken, met een maximum van drie embryo's.

De zwangerschappen werden bevestigd met een serum β -hCG bepaling ($> 25\text{IU/L}$) op dag 17 na de eicelpunctie of daarna, meerlingzwangerschappen werden vastgesteld door eenvoudige hartactie bij echoscopisch onderzoek, minimaal 31 dagen na de eicelpunctie.

De statistiek werd uitgevoerd met chi-kwadraat analyse.

Resultaten

De gemiddelde zwangerschapsresultaten na plaatsing in utero op dag 3 (26%) en op dag 5 (25%) en de respectievelijke implantatiepercentages per embryo, 13% en 12% zijn statistisch niet significant verschillend ($p>0,7$). De mediaan van het aantal embryo's dat werd teruggeplaatst was op dag 3: 2,4 en dag 5: 2,1.

De resultaten na ET op dag 3, onderverdeeld naar het ontwikkelingsstadium bij plaatsing, worden in tabel II gepresenteerd.

Van alle dag 3 ET's waren bij 20 (9%) alleen embryo's beschikbaar die of het 8-celstadium niet hadden bereikt of $> 20\%$ fragmenten bevatten. Bij 114 (49%) van de dag 3 ET's kon ten minste 1 embryo zonder fragmenten, bij 99 (42%) minimaal 1 embryo met >0 en $<20\%$ fragmenten in utero worden geplaatst. De implantatiepercentages van de embryo's zonder fragmentatie en die met $< 20\%$ fragmenten waren niet statistisch significant verschillend ($p=0,29$).

De resultaten die verkregen werden na plaatsing in utero op dag 5 staan in tabel III vermeld. Bij 114 (28%) patiënten met een ET, vertoonde geen enkel embryo tekenen van beginnende blastocoel vorming, bij 69 (17%) kwam de embryonale ontwikkeling niet verder dan morula's met aanwijzingen voor een beginnende blastocoel-vorming. Bij een derde van de patiënten ($n=142$, 35%) was minimaal één expanderende blastocyste aanwezig, bij 85 patiënten (21%) minimaal één niet geëxpandeerde blastocyste.

Blastocysten kenmerken zich door een significant hoger implantatiepercentage dan niet-cavi-terende embryo's na een kweekduur van vijf dagen ($p < 0,001$) en dan dag 3 embryo's met maximaal 20% fragmenten ($p < 0,001$).

Bij de patiënten die zwanger werden ($n=60$) na ET op dag 3, traden 9 meerlingzwangerschappen op (15%), waarvan 3 drielingen (5%).

In de groep met een plaatsing op dag 5, werden 102 patiënten zwanger. In deze groep waren 20 meerlingen (20%), in 8 gevallen na ET van 3 embryo's, waarvan 1 drieling.

Tabel II. Resultaten van embryoplaatsing na een kweekduur van drie dagen, onderverdeeld naar ontwikkelingsstadium.

<i>Embryonale ontwikkeling</i>	<i>n ET</i>	<i>Zwanger (% per ET)</i>	<i>Implantatie /embryo (%)</i>
Uitsluitend 1-3 embryo's(8-cellig)			
zonder fragmenten	59	19(32%)	26/145(18%)
Uitsluitend 1-3 embryo's(8-cellig)			
met >0 en <20% fragmenten	73	20(27%)	20/168(12%)
Gemengde ET's met 1-2 embryo's(8-cellig)			
zonder fragmenten	55	16(29%)	21/125(17%)
Gemengde ET's met 1-2 embryo's(8-cellig)			
met >0 en <20% fragmenten	<u>26</u>	<u>5(19%)</u>	<u>5/78(6%)</u>
Totaal	213	60(28%)	72/516(14%)
Uitsluitend minder goed ontwikkelde embryo's	20	0(0%)	-

Tabel III. Resultaten van embryoplaatsing na een kweekduur van vijf dagen, onderverdeeld naar ontwikkelingsstadium.

<i>Embryonale ontwikkeling</i>	<i>NET</i>	<i>Zwangerschap (% per ET)</i>	<i>Implantatie/embryo (%)</i>
Morula(e) met of zonder "sikkel cellen"			
met 1-2 minder ontwikkelde embryo's	157	9(6%)	10/363(3%)
Uitsluitend 1-3 morula met "sikkel cellen"	<u>26</u>	<u>3(12%)</u>	<u>4/38(11%)</u>
Totaal embryo's zonder duidelijke blastocoel	183	12(7%)	14/401(3%)†
Blastocyste(n) met of zonder			
1-2 minder ver ontwikkelde embryo's	85	24(28%)	35/199(18%)
Expanderende blastocyste met			
1-2 minder ontwikkelde embryo's	85	38(45%)	45/210(21%)
Uitsluitend 1-2 expanderende blastocysten	<u>57</u>	<u>28(49%)</u>	<u>33/95(35%)</u>
Totaal embryo's met blastocoel	227	90(40%)	113/504(23%)†

† embryo's zonder versus met blastocoel $p < 0,001$

Discussie

Na een embryokweek van vijf dagen is het mogelijk embryo's met een hoog implantatiepercentage te selecteren en dientengevolge een hoog percentage zwangerschappen te bereiken. Plaatsing in utero van twee blastocysten kan het ontstaan van drielingen vrijwel voorkomen. De langere kweekduur biedt mogelijkheden tot het uitvoeren van preïmplantatie-diagnostiek. Er is een principieel verschil tussen de selectie van embryo's na een kweekduur van drie en vijf dagen. Het embryonale genoom wordt actief (4) rond dag drie na de eicelpunctie, met als vermoedelijk gevolg dat er aanzienlijke verschillen in embryonale ontwikkeling vastgesteld kunnen worden in dezelfde kweekdruppel en kweekschaal. Dergelijke verschillen ziet men nog niet op dag 2, op welke dag nog steeds door vele centra de plaatsing van embryo's wordt uitgevoerd.

Onze huidige gegevens met betrekking tot dag 3 embryo's tonen aan dat er geen significante verlaging van het zwangerschapspercentage optreedt, indien licht gefragmenteerde embryo's (<20%) teruggeplaatst worden, zowel wat betreft het aantal zwangerschappen per ET als implantatie per embryo.

Na een kweekduur van 4 dagen is het mogelijk beter te selecteren (83). Het probleem op dag vier is dat classificatie van het embryo door het optreden van compactie moeilijker is, het is

dan lastig om 10 cellige stadia te onderscheiden van vroege morulae. Het implantatiepercentage per embryo op dag 4 van die embryo's (18%) die een beginnende blastocoelvorming hadden lag bij 40% (83).

Het implantatiepercentage van expanderende en vroege blastocysten was statistisch niet verschillend. Het zwangerschaps c.q. implantatiepercentage van respectievelijk 49% en 35% na ET van 1-2 expanderende blastocysten (n=57) doet vermoeden dat hiermee nog betere resultaten verkregen kunnen worden. Een definitief antwoord vereist een nog groter aantal patiënten.

Daar de gemiddelde implantatiepercentages van embryo's op dag 3 en 5 niet significant verschillen, lijkt er geen schadelijk effect uit te zijn op de embryokwaliteit bij de verlengde kweekduur. De aanzienlijke verschillen in de morfologie van de embryo's na vijf dagen kweken in dezelfde kweekdruppel moeten derhalve geïnterpreteerd worden als inter-individuele verschillen tussen embryo's. In tegenstelling tot de situatie bij plaatsing op dag 3, wordt als gevolg van natuurlijke selectie de menselijke interventie op dag 5 bij het selecteren van embryo's beperkt.

De kweekomstandigheden in ons laboratorium worden streng gecontroleerd. Elke broedstoof wordt dagelijks geijkt wat betreft temperatuur en partiële CO₂ spanning met betrouwbare externe apparatuur. Na de inspectie op pronucleusvorming worden de embryo's verder in de stoof met rust gelaten tot het moment van ET.

Het gebruiken van een extern CO₂ controleapparaat voor een snel herstel van partiële CO₂ spanning en het gebruik van minerale olie verkleinen pH veranderingen in het kweekmedium ten gevolge van vaak openen van de deur van de broedstoof.

Olivennes et al.(84) toonden aan dat plaatsingen op dag 5 in een geselecteerde patiëntengroep tot goede resultaten leidden. Het kweekstelsel van deze auteurs bestond uit een co-cultuur (apencellen).

Verdere studies zijn nodig om exact vast te stellen welk ontwikkelingsstadium minimaal bereikt moet worden op dag 5 om tot een zwangerschap te kunnen leiden.

Een langere kweekduur maakt het mogelijk, op basis van de embryonale ontwikkeling, individueel een betere prognose te kunnen geven over de afloop van de behandeling.

DEEL 3

De kans op plaatsing in utero van blastocysten na een kweekduur van vijf dagen wordt bepaald door het aantal gepuncteerde eicellen en niet primair door de leeftijd van de vrouw.

(naar oorspronkelijk artikel Fertil Steril 1998;69:78-83. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. Blastocyst transfer in day 5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age.)

Samenvatting

Het doel van deze prospectieve studie is het onderzoeken van de effecten van de leeftijd van de vrouw en van het behandelingscyclusnummer op de kans blastocysten in kweek te krijgen, met als gevolg een kansrijke ET. Deze studie werd uitgevoerd in het IVF centrum Düsseldorf. Het geanalyseerde materiaal (n=1099) bestond uit plaatsingen in utero na een celkweek van vijf dagen. De embryonale ontwikkeling van ET's in opeenvolgende cycli met plaatsing op dag vijf werd onderzocht op het voorkomen van blastocysten. Het ET-beleid bestond uit plaatsing in utero van maximaal 2 blastocysten of een combinatie van minder ontwikkelde embryo's. In dergelijke gevallen werden maximaal 3 embryo's in utero geplaatst.

Als eindpunten werden het percentage blastocystevorming, klinische zwangerschappen en implantatie per embryo bepaald.

Van 929 patiënten in de eerste cyclus, ontwikkelden 545 (59%) op zijn minst één blastocyste.

In de daaropvolgende tweede cyclus met een dag 5 ET trad bij 77 patiënten (51%) van 151 uit cyclus 1 wederom blastocystevorming op. Van 143 patiënten die in cyclus 1 geen blastocyste vormden, trad bij 50 patiënten (35%) daarentegen in cyclus 2 wel blastocystevorming op.

Bij beschouwing van alle vijfde dag transfers met cyclusnummer 1-4, werden de volgende implantatiepercentages per embryo berekend voor plaatsing in utero met één of meer blastocysten: cyclus 1 (n=545) 23%, cyclus 2 (n=264) 23%, cyclus 3 (n=110) 14% en cyclus 4 (n=27) 12%. Indien er geen embryo's met een blastocoel voor plaatsing in utero beschikbaar

waren dan waren deze cijfers van respectievelijk cyclus 1-4: 6% (n=384), 6% (n=193), 2% (n=94), 3% (n=35).

De negatieve correlatie tussen de chronologische leeftijd van de vrouw en blastocystevorming lijkt in de eerste plaats veroorzaakt te worden door het aantal gepuncteerde eicellen.

Concluderend mag gesteld worden dat de implantatiekans van de blastocyst na cyclus 2 afneemt. De biologische leeftijd van de vrouw en niet zozeer de chronologische- bepaalt de mate waarin blastocystevorming optreedt en de daaraan gerelateerde zwangerschaps-/implantatiekans.

Inleiding

In een voorafgaande studie werd aangetoond dat na een kweekduur van vijf dagen blastocysten gevormd worden, met een hoge kans op implantatie (2). Het plaatsen van twee blastocysten in utero leidt tot een hoog zwangerschapspercentage, zonder het risico van een drie-lingzwangerschap.

In deze studie werden opeenvolgende IVF cycli met ET onderzocht om na te gaan wat voor factoren meespelen bij het ontstaan van blastocysten. Verder werd geanalyseerd in hoeverre het behandelingscyclusnummer van invloed is op de kans op implantatie en zwangerschap.

Materiaal en methoden

In deze studie werden alle paren met een ET na vijf dagen uit een lopende prospectief gerandomiseerde studie van ET na drie en vijf dagen ingesloten.

Er werd onderscheid gemaakt tussen twee verschillende groepen.

Groep 1: 1099 patiënten met een dag 5 ET in één of meer van hun behandelingscycli na IVF/ICSI-behandeling,

Groep 2: paren met uitsluitend een plaatsing op dag 5 in alle opeenvolgende cycli (n=294).

Het bestuderen van het leeftijdseffect op de blastocystevorming geschiedde door indeling van de patiënten in 3-jaars groepen van 22-47 jaar.

Het stimulatieprotocol bestond uit toediening van een lang werkend GnRH analoog, nafareline-acetaat, 200µg intranasaal tweemaal per dag vanaf de mid-luteale fase in de cyclus voorafgaand aan de behandelingscyclus. Nadat echoscopisch vastgesteld was dat de ovariële sup-

pressie met het GnRH-analoog voldoende was, werd ten vroegste op dag 3 van de cyclus gestart met hMG of FSH in een dosering van 150 IU/d hetzij intramusculair hetzij subcutaan. Eventuele individuele aanpassingen qua dosering vonden plaats op geleide van de gegevens van eerdere stimulaties.

De toediening van hCG, 10.000 IU I.M., vond plaats indien 2 of meer dominante follikels van minimaal 18 mm diameter werden gezien. De toediening van het GnRH-analoog werd gestopt op het moment dat hCG geïnjecteerd werd. Transvaginale echoscopisch geleide eicelpunctie werd 35 uur na de hCG-injectie uitgevoerd.

De luteale suppletie bestond uit 600 mg gemicroniseerd progesteron vaginaal in combinatie met 1500 IU hCG op dag 2, 5 en 8 na de eicelpunctie, tenzij symptomen van een dreigende overstimulatie aanwezig waren.

De analyse van het effect van het aantal oöcyten op de frequentie van blastocyste ET werd uitgevoerd door het vergelijken van patiënten waarbij vier of meer eicellen gepuncteerd werden. Na de bevruchting, werden de embryo's gekweekt in een standaard medium zonder co-cultuur onder minerale olie met strikte controle van de partiële CO₂-spanning in de broedstoof. Het herstel van de partiële CO₂-spanning na openen van de broedstoof werd geregeld met een extern systeem voorzien van snelle CO₂-injectie. Details van dit deel van de studie kunnen worden gevonden in referentie 2 of op het internet adres:

<http://huizen.dds.nl/~ghz/starlab.html>.

De embryonale ontwikkeling na een kweekduur van vijf dagen varieerde van 8-32 cellige stadia, morula, morula - blastula stadium: differentiërende morula stadia nog zonder een duidelijk blastocoel en caviterende embryo's: van vroege blastocysten met of zonder duidelijke embryoblast tot expanderende blastocysten met of zonder duidelijke embryoblast.

Na een kweekduur van drie dagen zou normaal gesproken een maximum van drie embryo's worden geplaatst. Echter na vijf dagen kweken werd dit aantal tot twee beperkt indien twee blastocysten met een duidelijke embryoblast voor plaatsing in utero ter beschikking stonden. In andere gevallen werd met de patiënten individueel besproken of 2 dan wel 3 embryo's in utero geplaatst zouden worden.

De zwangerschappen werden vastgesteld aan de hand van serum β -hCG-bepalingen (>25 IU/L) niet eerder dan 17 dagen na de eicelpunctie en bevestigd door het echoscopisch aantonen van enkel of meervoudige hartactie minimaal 31 dagen na de eicelpunctie.

De statistische bewerking van het materiaal vond plaats met chi-kwadraat analyse, Cochran-Mantel Haenzel statistiek en logistische regressie analyse.

Resultaten

In de eerste cyclus bestaande uit 929 patiënten met ET na vijf dagen, was bij 545 (59%) op zijn minst één blastocyste voor plaatsing in utero beschikbaar, in 384 gevallen trad geen blastocystevorming op.

Van 151 patiënten met een blastocyste in de eerste cyclus, trad bij 77 ook in de tweede cyclus blastocystevorming op (51%). Het was interessant vast te stellen dat van de 143 patiënten in cyclus 1, waarbij geen blastocyste aanwezig was, bij 50 patiënten (35%) in de tweede cyclus wel blastocystevorming optrad ($p=0,006$).

In totaal werden 946 ET's met één of meer blastocysten uitgevoerd, waaruit 321 klinische zwangerschappen (34%) ontstonden. Van de 586 dag 5 ET's zonder blastocyste ontstonden 47 (8%) zwangerschappen ($p=0,001$). Van de voornoemde 586 ET's zonder blastocyste, waren bij 228 patiënten niet meer dan 8-cellige stadia ontwikkeld. In deze groep traden acht zwangerschappen op (3,5%). Uit de resterende 358 ET's resulteerden de andere 39 zwangerschappen (10,9%), uit ontwikkelingsstadia die niet verder reikten dan differentiërende morula.

Als alle dag 5 ET's onderverdeeld werden naar behandelingscyclusnummer en het wel of niet beschikbaar zijn van een blastocyste, dan werd bij de eerste ($n=929$) en tweede ($n=457$) cyclus, met plaatsing in utero van tenminste één blastocyste, een embryo-implantatiepercentage van 23% en 23% gevonden (niet significant), voor minder ver ontwikkelde stadia respectievelijk 6% en 6%. In tegenstelling tot de resultaten na de eerste twee behandelingscycli werd in cyclus drie ($n=204$) en vier ($n=62$) een lager implantatiepercentage per embryo gezien. Na ET met minimaal één blastocyste ($p=0,02$) bedroeg dit respectievelijk 14% en 12%, na plaatsing in utero van minder ver ontwikkelde stadia respectievelijk 2% en 3% ($p=0,08$).

Het is duidelijk dat na een kweekduur van vijf dagen, de implantatiekans bij plaatsing in utero van een blastocyste drie maal zo hoog is als voor minder ver ontwikkelde stadia (relative risk 3,025).

Er is verder, rekening houdend met het cyclusnummer, een sterke correlatie tussen de chronologische leeftijd van de vrouw en de kans op blastocyste vorming ($p=0,0001$). Per leeftijds-groep van telkens drie jaar neemt de kans op een ET met minimaal 1 blastocyste met 14% af. Na verdere berekening met behulp van regressie-analyse blijkt de kans op een blastocyste ET met toenemend cyclusnummer telkens met 13% te verminderen.

Het aangetoonde effect van de leeftijd van de vrouw op de kans op blastocystevorming blijkt

afhankelijk te zijn van het aantal gepuncteerde eicellen. De samenhang tussen het aantal oöcyten en het ET-percentages met minimaal 1 blastocyste wordt in figuur 1 getoond ($p=0,0001$, odds ratio 1,395).

Als uitsluitend patiënten met meer dan 4 eicellen worden geëvalueerd, dan neemt de kans op ET met een blastocyste met 9,9% ($p=0,01$) per leeftijdsgroep af. In vergelijking met patiënten met maximaal 4 eicellen was de kans op ET met een blastocyste in deze groep (>4 eicellen) echter significant beter ($p=0,0001$, odds ratio 1,901), zie figuur 2. Tenslotte verklaart de toename van het aantal patiënten met minder dan vijf gepuncteerde eicellen ($p=0,001$) per hogere leeftijdsgroep de afname van het aantal patiënten met blastocystevorming in-vitro, zie figuur 3.

Discussie

Aangezien de plaatsing in utero van twee blastocysten op dag 5 na de eicelpunctie tot een hoog zwangerschapspercentage leidt (2) en het ontstaan van drielingen in principe voorkomt, werd onderzoek gedaan naar het herhaald optreden van blastocystevorming in opeenvolgende behandelingscycli, in afhankelijkheid van de leeftijd en ovariële respons op gonadotrofinen van de vrouw. Tevens werd de invloed van het cyclusnummer op zwangerschap en implantatiekans bij plaatsing in utero op dag 5 geëvalueerd.

Het implantatiepercentage per embryo is de resultante van de combinatie van embryonale en extra-embryonale factoren.

Belangrijke determinanten bij de embryo-implantatie zijn leeftijd (87), de kwaliteit van de embryo's (1,2); het verloop van vorige IVF cycli en vroegere zwangerschap (88), uterus-anomalieën (89,90,91,92) en problemen met de algehele gezondheid (93).

Verder kan de beslissing hoeveel embryo's in utero geplaatst moeten worden (94) afhankelijk zijn van een (dreigend) overstimulatiesyndroom, herhaalde slechte reactie van de ovaria op hyperstimulatie, beperkte verkrijgbaarheid van zaadcellen of voorstadia en de kwaliteit van invriesprogramma's voor zaadcellen en embryo's. In de USA speelt tevens een kostenaspect mee, gezien de financiële haalbaarheid voor velen van slechts 1 poging wordt de arts onder druk gezet zoveel mogelijk embryo's in utero te plaatsen.

Mugleton et al. (95) stellen dat *"the culture of human preimplantation embryo's from the 1-cell to the morula/blastula stage is not satisfactory"* en dat het noodzakelijk is de standaard-

kweekomstandigheden van het embryo te verbeteren. Het weinig frequent ontstaan van blastocysten in-vitro kan een aantal mogelijke oorzaken hebben. Gedurende een langere kweekduur kan de kwaliteit van de kweekomstandigheden een belangrijke rol spelen, in het bijzonder als broedstoven tussen de pronucleus-inspectie en ET om andere redenen vaak geopend worden, met als gevolg dat de temperatuur en partiële CO₂-spanning voor een langere tijdsduur verstoord worden. In deze studie, evenals in de vorige (2), werd een systeem met snelle correctie van de partiële CO₂-spanning gebruikt, waardoor binnen drie minuten na het openen en sluiten van de deur van de broedstoof de partiële CO₂-spanning weer op het gewenste niveau is. Met gebruikmaking van een standaardmedium en strikte controle van de kweekomstandigheden is dit kweekprobleem mogelijk opgelost. Uit overweging van mogelijke infectierisico's werd afgezien van co-cultuur-systemen (66, 96, 97,98,99,100). Bavister (52) schreef een overzichtsartikel over co-cultuur en stelde zich zeer kritisch op tegenover het gebruik daarvan.

De capaciteit van zygoten om zich tot een blastocyste te ontwikkelen wordt beïnvloed door het embryonale genoom en de activatie daarvan (4).

Menezo toonde aan dat embryo's met een ontwikkelingsstop een hoog percentage aneuploidie en mosaïcisme (102,103) vertoonden.

Het is een belangrijk gegeven dat bij 59% van alle paren plaatsing van een blastocyste mogelijk is in de eerste cyclus. Een langere embryokweek maakt het mogelijk om twee embryo's met een hoog implantatiepercentage te plaatsen. Zelfs als in de eerste cyclus geen blastocysten voor plaatsing in utero beschikbaar waren, bestaat in de volgende cyclus hierop nog een acceptabele kans. Door plaatsing in utero van niet meer dan twee blastocysten kunnen drielingen vermeden worden, uitgezonderd de mogelijkheid van een monozygote tweeling.

Het gemiddeld percentage van zygoten dat het blastocystestadium bereikt is meer een informatief aspect voor het functioneren van een embryokweekstelsel dan van direct belang voor de patiënt. Immers zouden toch maximaal 2 blastocysten in utero worden geplaatst. Het individuele percentage van zygoten dat een blastocyste vormt is afhankelijk van inter-individuele variatie in het aantal pronucleï, volgens de literatuur ook van paternale factoren en van het "Polycystic Ovarian Syndrome" (103,104).

De resultaten van onze studie tonen aan dat het niet a priori mogelijk is een patiëntencategorie te selecteren waarbij blastocystevorming optreedt. Het ontbreken van blastocysten in de eerste cyclus leidt tot een wat lagere kans op blastocystevorming in de tweede cyclus.

Tijdens celkweek langer dan twee of drie dagen worden de effecten van de activatie van het

embryonale genoom in kweek zichtbaar. Dit leidt tot natuurlijke selectie van embryo's die zich verder kunnen ontwikkelen.

De capaciteit van een embryo om zich tot een blastocyste te ontwikkelen is primair afhankelijk van het embryonale genoom, immers op dag vijf bestaat een aanzienlijke variabiliteit in ontwikkeling van embryo's afkomstig van één ouderpaar in één en dezelfde kweekdruppel.

Het is nog onduidelijk in hoeverre, na de tweede behandelingscyclus, de lagere implantatiekansen van embryo's die zich tot morfologisch optimale blastocysten hebben ontwikkeld, verklaard moet worden. Zijn hier vooral embryonale factoren van belang of liggen hieraan met name extra-embryonale factoren ten grondslag? Theoretisch zou door een eicel-donatieprogramma een duidelijkere uitspraak mogelijk zijn als embryo's van oudere eiceldonors bij jongere patiënten en vice versa geïmplanterd zouden worden, hetgeen uit ethische redenen onmogelijk is.

De vastgestelde effecten van het cyclusunnummer op de zwangerschapskansen in opeenvolgende cycli worden door grote studies bevestigd (75,105,106,107,108).

Het feit dat blastocystevorming in opeenvolgende cycli nogal sterk varieert, doet vermoeden dat de parentale factor hierbij van minder belang is. Het lijkt waarschijnlijk dat het embryonale genoom een grote rol speelt bij de kans om een ET met blastocysten te krijgen.

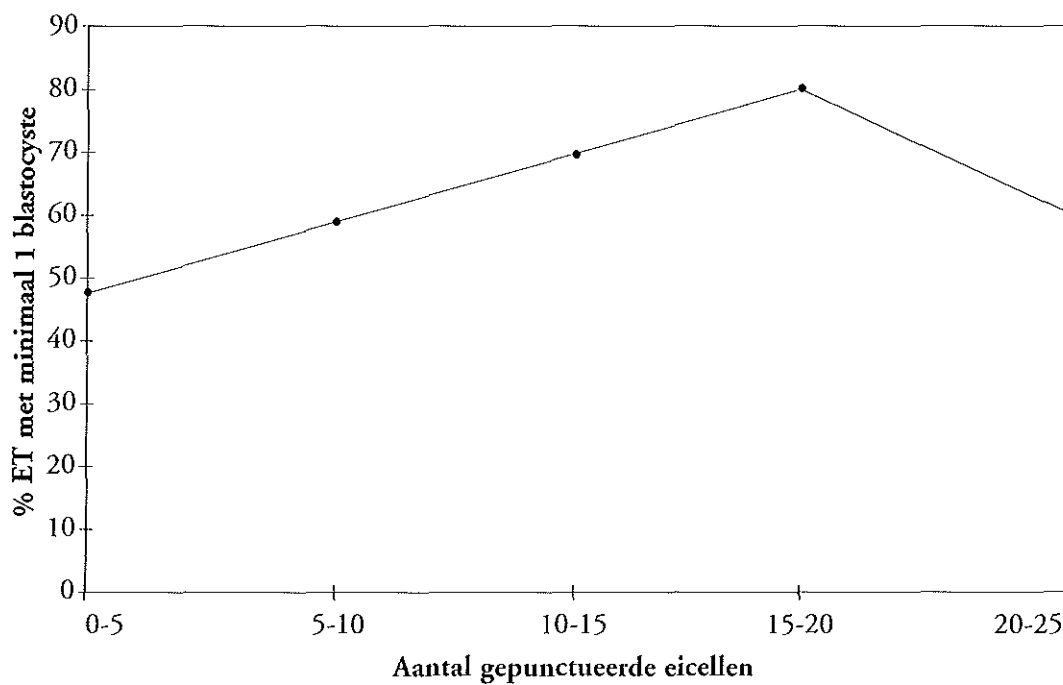
Bij toename van de leeftijd van de vrouw is het aantal gewonnen eicellen de primair bepalende factor t.a.v de kans op blastocystevorming in vitro, in het bijzonder vanaf een leeftijd van 37 jaar. Roest et al.(109) beschreven dat de lagere kans op een zwangerschap bij een oudere vrouw voornamelijk te wijten is aan een geringer aantal beschikbare eicellen.

Langer kweken heeft als neveneffect dat een geringer aantal embryo's geschikt is om te worden ingevroren, aangezien het weinig zinvol is embryo's met een ontwikkelingsstop in te vriezen. Technisch gaat het invriezen van blastocysten gepaard met kwaliteitsverlies, mogelijk veroorzaakt door minder optimale ontdooiing van de embryoblast (98,110,111). In het IVF-centrum te Zwolle wordt daarom gedurende 4 dagen gekweekt. Er is dan enerzijds het voordeel van de natuurlijke selectie van embryo's en anderzijds een betere mogelijkheid om beginnende blastocysten in te vriezen (persoonlijke mededeling dr. H. Cleine, hoofd IVF-lab Zwolle).

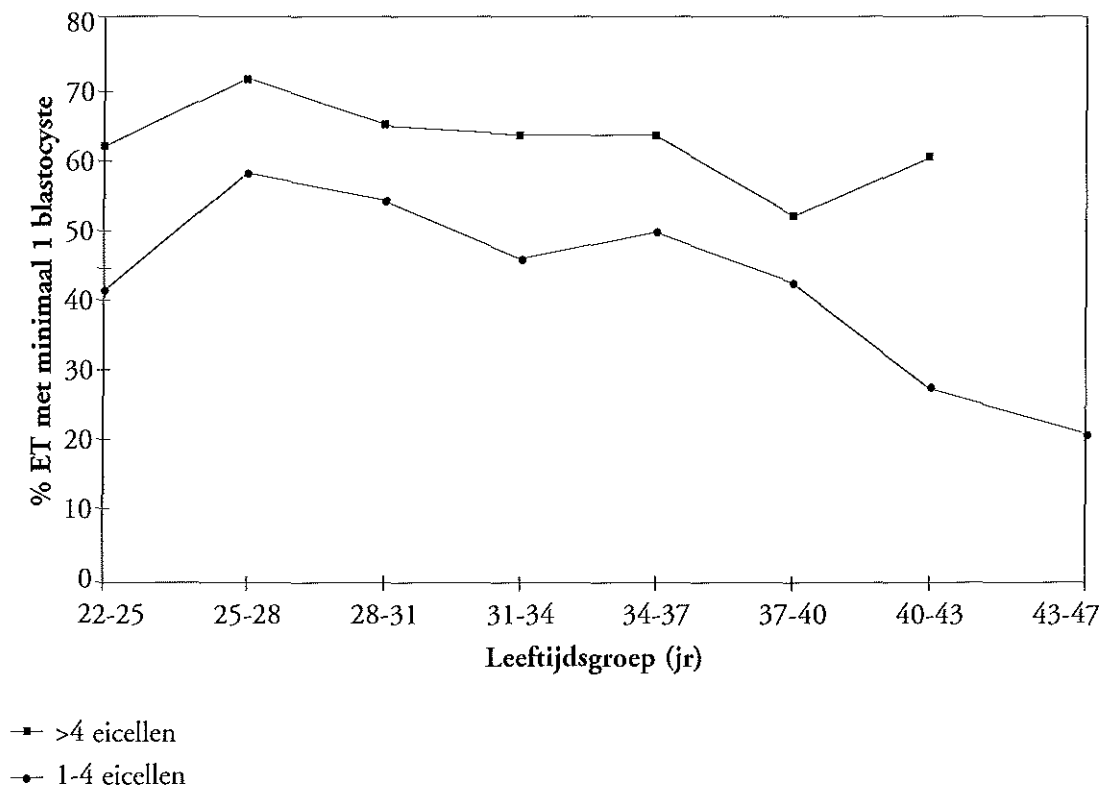
Afwezigheid van blastocystevorming in-vitro biedt slechte vooruitzichten op een zwangerschap ten gevolge van een lage (2-6%) implantatiekansen van embryo's zonder blastocoel.

De ontwikkelingspotentie van een embryo wordt bepaald door het embryonale genoom, desondanks moet verder aandacht geschonken worden aan een verbetering van de embryokweek.

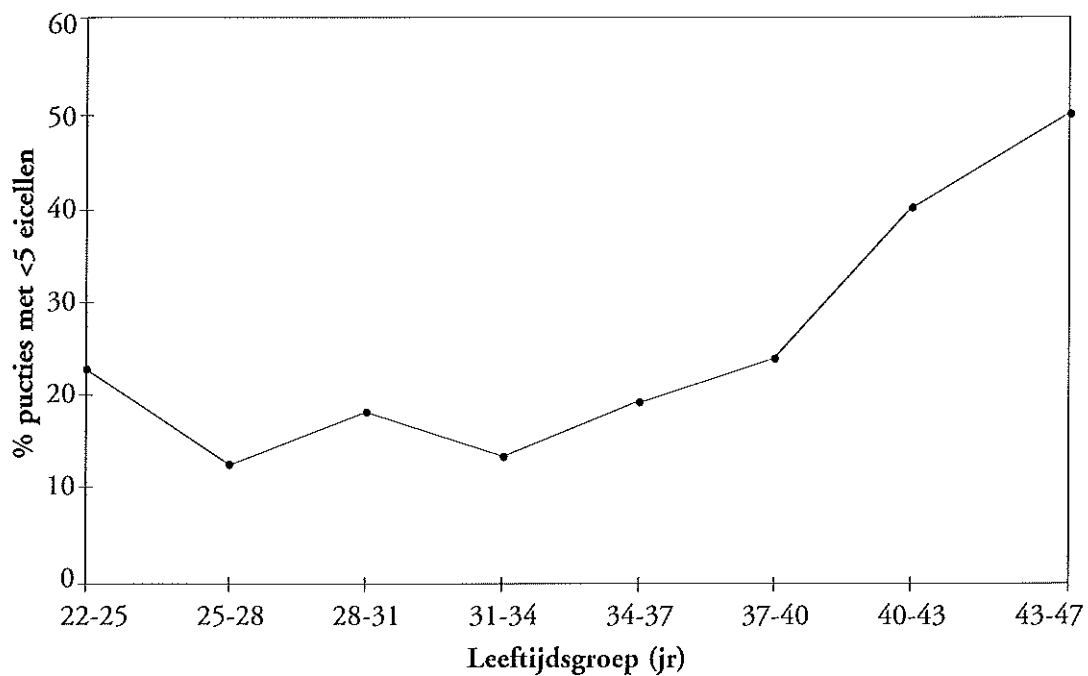
Figuur 1. Percentage embryoplaatsingen met minimaal een blastocyste in relatie tot het aantal gepunctueerde eicellen



Figuur 2. Het percentage embryoplaatsingen met minimaal 1 blastocyste: de relatie met het aantal gepunctueerde eicellen en de leeftijd van de vrouw



Figuur 3. De relatie tussen het aantal gepuncteerde eicellen en de leeftijd van de vrouw:
het percentage eicelpuncties met <5 eicellen



Referenties

1. van Os HC, Alberda ATh, Janssen-Caspers HAB, Leerentveld RA, Scholtes MCW, Zeilmaker GH. The influence of the interval between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome. *Fertil Steril* 1989;51:360-2.
2. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:1245-48.
3. Noyes WN, Dickmann Z. Survival of ova transferred into the oviduct of the rat. *Fertil Steril* 1961;12:67-79.
4. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332:459-61.
5. Bonduelle ML, Dodd R, Liebaers I, Van Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryo's derived from trippronucleate zygotes. *Hum Reprod* 1988;3:909-14.
6. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:855-9.
7. Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Rutter WJ, Werb Z. Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* 1995;121:2513-23.
8. Warner CM, Gollnick SO, Goldberg SB. Linkage of the preimplantation-embryo-development (Ped) gene to the mouse major histocompatibility complex (MHC). *Biol Reprod* 1987;36:606-10.
9. Seidel F. Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei. *Naturwissenschaften* 1952;39:355-6.
10. Gardner RL. Can developmentally-significant spatial patterning of the egg be discounted in mammals ? *Hum Reprod Update* 1996;2:3-27.
11. Handyside AH, Delhanty JDA. Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In: *Preconception and Preimplantation Diagnosis of Human Genetic Disease*, Edwards RG, editor. Cambridge University press, Cambridge, UK 1993;239-70.

12. Monk M, Handyside AH. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J Reprod Fertil* 1988;82:365-8.
13. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5:708-14.
14. Tarin JJ, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage. *Fertil Steril* 1992;58:970-6.
15. Hartshorne GM, Gardner RL, Edwards RG. Micromanipulation of blastocysts for the diagnosis of genetic disease. In: *Preconception and Preimplantation Diagnosis of Human Genetic Disease*, Edwards RG, editor. Cambridge University press, Cambridge, UK 1993;271-98.
16. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Human blastocysts grown in culture. *Nature* 1971;229:132-3.
17. Handyside AH, Hunter S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Arch Dev Biol* 1986;5:519-26.
18. Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* 1989;107:597-604.
19. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994;166:259-67.
20. Verlinsky Y, Morozov G, Gindilis V, Strom CM, Freidin M, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Zdanovsky V, Kuliev A. Homeobox gene expression in human oocytes and preembryos. *Mol Reprod Dev* 1995;41:127-32.
21. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 1997;3:919-25.
22. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-91.
23. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995;15:41-9.

24. Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:1492-8.
25. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
26. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
27. Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994;266:1376-80.
28. Murray AW. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:5-11.
29. Delhanty JDA, Handyside AH. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 1995;1:201-15.
30. Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod* 1995;10:1912-22.
31. Juriskova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996;2:93-8.
32. Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951;26:59-86.
33. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997;56:1088-96.
34. Pierce GB, Lewellyn AL, Parchment RE. Mechanism of programmed cell death in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3654-8.
35. Edwards RG, Surani MA. The primate blastocyst and its environment. *Ups J Med Sci Suppl* 1978;22:39-50.
36. James RM, West JD. A chimaeric animal model for confined placental mosaicism. *Hum Genet* 1994;93:603-4.
37. Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM, de Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. *Hum Reprod*. 1989;4(8 Suppl):99-103.
38. Epstein CJ, Smith SA. Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1973;33:171-84.

39. Mills RM, Brinster RL. Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. *Exp Cell Res* 1967;47:337-44.
40. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1996;44:476-85.
41. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1996;106:299-30.
42. Brinster RL, Thomson JL. Development of eight-cell mouse embryos in vitro. *Exp Cell Res* 1966;42:308-15.
43. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:560-7.
44. Biggers JD, Gardner DK, Leese HJ. Control of carbohydrate metabolism in preimplantation mammalian embryos. In: *Growth factors in mammalian Development*. Rosenblum IY, Heyner S, editors. CRC Press 1989 Boca Raton, FL, USA, p 19-32.
45. Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl* 1971;14:7-21.
46. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1984;72: 9-13.
47. Gardner DK; Leese HJ. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum Reprod* 1986;1:25-7.
48. Leese HJ. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf Rev Reprod Biol* 1991;13:35-72.
49. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;26:90-100.
50. Biggers JD, Bell JE, Benos DJ. The mammalian blastocyst: transport function in a developing epithelium. *Am J Physiol* 1987;255:C419-C438.
51. Bolton VN, Wren ME, Parsons JH. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril* 1991;55:830-2.
52. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91-148.
53. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997;3:367-82.
54. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation

- human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996;65:349-53.
55. Whitten WK. Nutrients requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. In: *Advances in the Biosciences*. Raspe G, editor. Pergamon Press, 1971, New York, p129-41.
 56. Pinyopummintr T, Bavister BD. Minimum energy substrate requirements for early cleavage stages of bovine embryo development in vitro. *Theriogenology* 1995;43:299.
 57. Allen RL, Wright RW Jr. In vitro development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. *J Anim Sci* 1984;59:1657-61.
 58. Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987;81:23-8.
 59. Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod* 1993;49: 582-7.
 60. Gandolfi F, Brevini TA, Moor RM. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;38:107-15.
 61. Gandolfi F, Brevini TA, Richardson L, Brown CR, Moor RM. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 1989;106:303-12.
 62. Moore K, Bondioli KR. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod* 1993;48:833-40.
 63. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1991;92:125-31.
 64. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1989;85:715-20.
 65. Bongso A, Ng SC, Ratnam S. Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990;5:893-900.
 66. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991;56:179-91.
 67. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum Reprod* 1993;8:1155-60.

68. Menezo YJ, Guerin JE, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990;42:301-6.
69. Yeung WS, Ho PC, Lau EY, Chan ST. Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod* 1992;7:1144-9.
70. Bongso A, Soon Chye Ng, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989;4:706-13.
71. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992;58:569-74.
72. Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989;52:503-8.
73. Jayot S, Verdaguer S, Discamp G et al. Cocultures embryonnaires sur cellules endometriales en FIV. *Contracept Fertil Sex* 1993;21:440.
74. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. *Fertil Steril* 1994;61:976-8.
75. Plachot M, Antoine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca AM, Salat-Baroux J. Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993;8:2133-40.
76. Plachot M, Alvarez S, Merviel P et al. Role of endometrial cells in in-vitro embryo development. *Assist Reprod Rev* 1994;4:85-90.
77. Plachot M. Coculture embryonnaire apres fecondation in vitro. A qui benefice-t-elle ? *Reprod Hum Horm* 1995;8:269-76.
78. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod* 1992;7:1339-41.
79. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-8.
80. Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, Cohen SW, Hamilton M, Simon JA, Thorneycroft IH, Marshall JR. Biologic and morphologic development of donated human ova recovered by nonsurgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:211-7.

81. Gardner DK, Pawelczynski M, Trounson A. Nutrient uptake and utilisation can be used to select 'viable' day-7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 1996;44:472-5.
82. Lane M, Gardner DK. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using metabolic criterion. *Hum Reprod* 1996;11:1975-8.
83. Huisman GJ, Alberda ATh, Leerenveld RA, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A comparison of in vitro fertilisation results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril* 1994;61:970-1.
84. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, Frydman R. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Human Reprod* 1994;9:2367-73.
85. Plasma protein fraction (human). In: Code of federal regulations. Washinton, D.C.:Food and Drugs, 1990;21:133-5.
86. Zeilmaker GH. Cryopreservation and related IVF activities. In: Alberda A, Gan RA, Vemer HM editors. *Pioneers in IVF*. London U.K.: Parthenon Publishing Group, 1995;81-9.
87. Hull MGR, Fleming CE, Hughes AO, McDermott A. The age-related decline in female fecundity: a qualitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996;65:783-90.
88. Molloy D, Doody ML, Breen T. Second time around: a study of patients seeking second assisted reproduction pregnancies. *Fertil Steril*;1995;64:546-51.
89. Nickerson CW. Infertility and the uterine contour. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:268.
90. Sorensen SS. Minor mullerian anomalies and oligomenorrhoea in infertile women: a new syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:636.
91. Schmidt G, Fowler WC, Talbert LM, Edelman DA. Reproductive history of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Fertil Steril* 1980;33:21.
92. Karande VC, Lester RG, Muasher SJ, Jones DL, Acosta AA, Jones HW Jr. Are implantation and pregnancy outcome impaired in diethylstilbestrol-exposed women after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1990;54:287-91.
93. Ashkenazi J, Farhi J, Dicker D, Feldberg D, Shalev J, Ben-Rafael Z. Acute pelvic inflammatory disease after oocyte retrieval: adverse effects on the results of implantation. *Fertil Steril* 1994;61:526-8.

94. Roest J, van Heusden AM, Verhoeff A, Mous HVM, Zeilmaker GH. A triplet pregnancy after in vitro fertilization is a procedure-related complication that should be prevented by replacement of two embryos only. *Fertil Steril* 1997;67:290-5.
95. Muggleton-Harris AL, Findley I, Whittingham DG. Improvement of the culture conditions for the development of human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1990;5:217-20.
96. Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in coculture on Vero cells: a randomized study. *Fertil Steril* 1994;61:521-5.
97. Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod* 1994;9:1131-5.
98. Menezo YJ, Sakkas D, Janny L. Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc Res Tech* 1995;32:50-6.
99. Janny L, Vye P, Pouly JL, Hazout A, Dumont M, Nicoliet B, Menezo Y. Cocultures: diagnostic and therapeutic value. *Contracept Fertil Sex* 1993;21:391-4.
100. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Fiorentino A, D'Errico A. Human embryo co-culture: results of a randomized prospective study. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995;40:254-9.
101. Menezo YJ, Nicollet B, Dumont M, Hazout A, Janny L. Factors affecting human blastocyst formation in vitro and freezing at the blastocyst stage. *Acta Eur Fertil* 1993;24:207-13.
102. Menezo YJ, Ben-Khalifa M. Cytogenetic and cryobiology of human cocultured embryos: a 3-year experience. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:35-40.
103. Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994;38:36-42.
104. Deaton JL, Dempsey RA, Miller KA. Serum from women with polycystic ovary syndrome inhibits fertilization and embryonic development in the murine in vitro fertilization model. *Fertil Steril* 1996;65:1224-8.
105. Tan SL, Royston P, Campbell S, Jacobs HS, Betts J, Mason B, Edwards RG. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilization. *Lancet* 1992;339:1390-4.
106. Yovel I, Geva E, Lessing JB, Yaron Y, Botchan A, Amit A. Analysis of the fourth to eighth in vitro fertilization treatments after three previously failed attempts. *Hum Reprod* 1994;9:738-41.

107. FIVNAT. Evolution of prognostic criteria of in vitro fertilization according to the rank of attempts. *Contracept Fertil Sex* 1994;22:282-6.
108. Alsalili M, Yupze A, Tummon I, Parker J, Martin J, Daniel S, Rebel M, Nisker J. Cumulative pregnancy rates and pregnancy outcome after in-vitro fertilization:>5000 cycles at one centre. *Hum Reprod* 1995;10:470-4.
109. Roest J, van Heusden AM, Mous H, Zeilmaker GH, Verhoeff A. The ovarian response as a predictor for successful in vitro fertilization treatment after the age of 40 years. *Fertil Steril* 1997;66:969-73.
110. Takagi M, Sakonju L, Otoi T, Hamana K, Suzuki T. Postthaw viability of the inner cell mass of in vitro-matured/in vitro -fertilized bovine embryos frozen in various cryo-protectants. *Cryobiology* 1994;31:398-405.
111. Kaufman RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, Dumont M, Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995;64:1125-9.

HOOFDSTUK IV

Genetische aspecten van infertiliteit bij de man

DEEL 1

Inleiding

Bepaalde vormen van sub/infertiliteit berusten op een genetische basis. Door het beschikbaar komen van nieuwe voortplantingstechnieken (ICSI) voor paren met tot nu geen of uiterst beperkte kans op nageslacht, ontstaan nieuwe mogelijkheden. Vooral paren met een andrologische factor kunnen profijt hebben van ICSI. Daarbij komt nog de mogelijkheid om chirurgisch verkregen zaadcellen uit epididymis of testis (MESA, TESE) te gebruiken.

De introductie van deze nieuwe technieken roept vragen op of bepaalde genetische afwijkingen aan de volgende generatie kunnen worden doorgegeven, of dat de gebruikte procedures genetische afwijkingen van gameten of ontwikkelingsstoornissen van het embryo kunnen veroorzaken. Daar ICSI vooral voor behandeling van paren met andrologische problemen bedoeld is, staan genetische oorzaken van mannelijke infertiliteit op de voorgrond.

Bij de vrouw is, alleen na eicelafname, morfologisch het cumulus-eicel complex te beoordelen. Bij ICSI wordt systematisch de cumulus verwijderd en dan is het mogelijk het voltooid zijn van de meiose van de eicel te beoordelen (1,2), aanwezigheid van een kiemblaas, metafase I, metafase II en morfologie van het cytoplasma te bepalen (3,4). De chromosomale samenstelling van de eicel (5) wordt daarbij niet beschouwd. Een samenhang van cytoplasmatische afwijkingen van de eicel en de chromosomale status lijkt aanwezig (2).

Kwalitatieve en kwantitatieve spermaparameters laten volgens WHO criteria (6) een relatief eenvoudige eerste beoordeling over subfertiliteit toe.

Bij mannelijke infertiliteit kunnen chromosoomafwijkingen (7,8,9) op verschillende manieren een rol spelen:

1. de man is drager van een gebalanceerde structurele chromosoomafwijking.
2. chromosomaal mozaïek van de man in lichaams- en/of geslachtscellen.
3. erfelijke meiose stoornissen, zoals asynapsie enz.

Cytogenetisch onderzoek in bloed leert alleen over oorzaak 1, van zaadcellen alleen over oorzaak 2. Onderzoek van afzonderlijke zaadcellen is in sommige laboratoria een research techniek, doch is niet routinematig beschikbaar.

ad 1. Talrijke studies zijn gewijd aan de incidentie van chromosoomafwijkingen bij mannen met oligo/azoöspermie. De Braekeleer (9) stelt dat 12% van de mannen met $<10.10^6$ zaadcellen per ml een chromosoomafwijking heeft, grotendeels bestaande uit geslachtschromosomale afwijkingen en translocaties. Er zijn grote verschillen tussen studies door uiteenlopende grootte en selectie van patienten. In een samenvatting van 7 studies met 5625 oligo/azoösperme mannen waren er 5,15% geslachtschromosomale afwijkingen en 1,13% reciproke en Robertsoniaanse translocaties. Een controleserie van pasgeborenen toonde 0,19% en 0,17% voor deze afwijkingen. Bij azoöspermie (n=1450 mannen) is de frequentie van geslachtschromosomale afwijkingen 14,48%, bij oligospermie (n=2105) 2,09%. Robertsoniaanse en reciproke translocaties zijn frequenter (2,4%) bij oligospermie dan bij azoöspermie (0,95%).

Ad 2. Chromosoomanalyse van zaadcellen vereist decondensatie van het erfelijk materiaal in de zaadcel, gevolgd door chromosoom identificatie mbv. een van de nieuwere identificatietechnieken; doel is aantal en vorm van chromosomen per zaadcel vast te stellen. Een voorbeeld is de hamstereiceltest (10), waarbij zonavrije hamstereicellen met zaadcellen geïncubeerd worden. Na penetratie van het oölemma ontstaat decondensatie van de zaadcelkop, specifieke chromosomen benadering is dan mogelijk. Deze tijdrovende techniek is slechts op een beperkt aantal zaadcellen toepasbaar daarmee is er mogelijk selectie van die zaadcellen die de hamstereicel kunnen binnendringen en kunnen decondenseren. Bovendien worden de onderzochte cellen nooit meer voor voortplanting gebruikt.

Analyse van interfase-spermatozoa is mogelijk d.m.v. fluorescentie in situ hybridisatie, FISH (11, 12), met probes (aftesters) die of specifieke chromosomen of zelfs zeer kleine chromosoomdelen (bv. voor deletie detectie) herkennen. De steekproef uit de zaadcelpopulatie kan met deze techniek groter zijn, omdat deze onafhankelijk is van al of niet chromatinedecondensatie (zoals bij de hamster eiceltest). Omdat de analyse interfasekernen bekijkt, is er geen onderscheid tussen levend of dood materiaal, bewegelijke of onbewegelijke, morfologisch normale en afwijkende zaadcellen.

Technische problemen kunnen ontstaan als slechts met één marker wordt gewerkt waarbij geen onderscheid mogelijk is tussen nullisomie en falen van de hybridisatie.

Tevens kunnen vaak hooguit 3 markers met fluorescentie met verschillende golflengten tegelijk gebruikt worden waardoor men van tevoren moet selecteren welke chromosoomveranderingen men per analyse wil onderzoeken.

Voor alle chromosoomparen zijn thans relevante FISH-markers beschikbaar, waardoor analyse van spermatogene aneuploidie minder beperkt geworden is dan kortgeleden (13).

Een aantal overwegingen met betrekking tot de chromosomale status van zaadcellen en de eventuele gevolgen daarvan voor nakomelingen is relevant bij het uitvoeren van ICSI.

Uit een studie van Spriggs et al. (13) bij normale mannen bleek dat disomie vaker voorkomt bij de geslachtschromosomen (0,43%) en chromosoom 21 (0,29%). Dit was reeds eerder bij karyotypering van zaadcellen vastgesteld (14). Een grote studie van Guttenbach et al. (15) kon bij infertiele mannen, 2 uitgezonderd, geen verhoogd percentage disomie noch van geslachtschromosomen (X: 0,1%, Y: 0,14%), noch van autosomen in vergelijking met fertiele mannen aantonen. De ondergrens van de zaadcelconcentratie in deze groep mannen was $0,5 \cdot 10^6$.

Moosani et al. (16) vonden wel een hoger percentage aneuploïde zaadcellen bij infertiele mannen. Zij onderzochten zaadcellen met de hamstercel test en FISH, het aantal onderzochte mannen was klein ($n=5$).

Voor een uitgebreid overzicht over chromosoomstudies van menselijke zaadcellen en de daarmee samenhangende technische problemen mag naar Egozcue et al. (17) verwezen worden.

Bij analyse van chromosomale afwijkingen van nakomelingen na toepassing van ICSI is het relevant van welke ouder chromosomale afwijkingen stammen.

Het is tegenwoordig mogelijk betrouwbaar vast te stellen van welke ouder een trisomie afkomstig is (18), in meer dan 85% wordt autosomale trisomie door maternale non-disjunctie veroorzaakt (19,20,21). Het extra X chromosoom in 47, XXX vrouwen is in 90% van maternale oorsprong (22). Het extra Y chromosoom bij 47, XYY mannen is van paternale oorsprong, 47% van 47, XXY mannen en 80% van 45, X vrouwen (23) berust op een paternale meiosestoornis.

Embryologie

In de 3e - 5e zwangerschapsweek migreren kiemcellen van de dooierzak naar de zich in het retroperitoneum ontwikkelende gonaden, bestaande uit een cortex en medulla. Indien de kiemcellen deze primitieve gonaden niet bereiken dan ontstaat gonadale dysgenese.

De ontwikkeling van testis of ovarium uit een ongedifferentieerde oorsprong begint bij de mens gedurende zwangerschapsweek 5-7. Als geen testis-bepalende genen aanwezig zijn dan ontstaat automatisch een ovarium.

De differentiatie tot een testis is dus een actief proces, dat voor zover bekend, onder invloed van een aantal genen plaatsvindt (zie Tabel I, II, + Fig. 1). In de embryonale testis worden de tubuli seminiferi en het rete testis afgeleid uit de primitieve geslachtsstrengen. De binnenzijde van de tubuli seminiferi bevat Sertolicellen en spermatogonia, aan de buitenzijde differentieren mesenchymale voorlopers zich tot Leydigcellen.

De uitrijping van het tubulaire systeem wordt geïnduceerd door testosteron uit de Leydigcellen, onder invloed van placentair hCG. De ipsilaterale ductus mesonephricus (gang van Wolff) differentieert onder invloed van testosteron tot het distale 2/3 gedeelte van de epididymis, vas deferens, vesicula seminales en ductus ejaculatorius. De Müllerian inhibiting factor, MIF, een product uit de Sertoliceel, bewerkstelligt de regressie van de ipsilaterale ductus paramesonephricus (gang van Müller). Bij ontbreken van de MIF ontstaan dus de tuba fallopii, uterus en bovenste 2/3 gedeelte van de vagina.

Intracellulair in het tuberculum genitale en de genitale wallen wordt testosteron door 5α reductase omgezet in dihydrotestosteron (DHT). De aanwezigheid van DHT induceert een uitrijping tot mannelijke genitalia externa, afwezigheid van DHT tot vrouwelijke.

Genetische aspecten van de mannelijke geslachtsdeterminatie en differentiatie

De geslachtsdifferentiatie omvat zowel somatische differentiatie als gonadale determinatie; de transformatie van de ongedifferentieerde gonade in testis of ovarium. De regulering van gonadale determinatie en somatische differentiatie wordt bepaald door genetische en endocrinologische factoren.

Genetische regulering

Het Y-chromosoom is een klein acrocentrisch chromosoom met een korte arm Yp en een lange arm Yq. Over de beide armen is een euchromatische zone van constante grootte verdeeld, het heterochromatische gebied is wisselend van grootte. Het paren van X en Y chromosoom tijdens de mitose/meiose vindt plaats tussen homologe euchromatische regio's op voornoemde chromosomen.

Om tot een volwassen mannelijk fenotype te komen zijn achtereenvolgend 2 processen noodzakelijk: a. geslachtsdeterminatie b. geslachtsdifferentiatie (Tabel I en fig 1).

a. Geslachtsdeterminatie

Hoewel de exacte mechanismen nog niet allemaal opgehelderd zijn, heeft Ogata et al. (24) een hypothese geformuleerd over het functioneren van de testis determinatie. Op Yp ligt een regulerend gen "SRY" ofwel testis determining factor, dat een gen op het X chromosoom p21.2-p22.11, "SRVX" zou remmen. SRVX zou weer een remmende werking hebben op een autosomaal locus dat verantwoordelijk is voor de differentiatie van de primitieve gonade tot een testis. De normale uitrijping tot mannelijk individu vereist dat alle genen in deze keten op de juiste plaats aangelegd en normaal functionerend zijn, dus SRY op het Y-chromosoom (niet als translocatie op het X chromosoom, XX male syndrome), enkelvoudig en zonder mutatie/deletie.

Een reeks van ook autosomale genen is betrokken bij de testiculaire determinatie in samenwerking met het SRY gen (25), zie Tabel I.

b. Geslachtsdifferentiatie

De geslachtsdifferentiatie wordt enerzijds voltooid door regressie van de gang van Müller (ductus paramesonephricus) onder invloed van het anti-Müllerian hormoon (AMH) uit de Sertoliceel en anderzijds stimulatie onder regie van testosteron, dihydrotestosteron en een functionerende androgeenreceptor. De productie van testosteron via de Leydigcel komt door een samenspel van genetische loci tot stand (Tabel I en fig.1.).

Genetische aspecten van infertiliteit bij de man

Verskillende genetische mechanismen moeten worden onderscheiden als oorzaak voor infertiliteit bij de man. Simpson (26) maakt een onderverdeling in:

1. Polygene / multifactoriële oorzaken,
2. Chromosomale afwijkingen (Tabel III), meiosestoornissen,
3. "Single gene" afwijkingen (27).

Het onderkennen van een genetische oorzaak van subfertiliteit c.q. infertiliteit kan grote consequenties hebben. Er kan een verklaring gegeven worden voor de oorzaak van het vruchtbaarheidsprobleem en voor frequent optredende abortus. Soms is een ingreep mogelijk om de onvruchtbaarheid te omzeilen, zonder te kunnen corrigeren, zoals ICSI, al dan niet aangevuld met preïmplantatie/prenataal onderzoek.

Het toeschrijven van de infertiliteit aan een genetische oorzaak betekent een definitief "vonnis" voor de betrokken patiënt, maar kan tevens leiden tot een betere verwerking van het probleem en berusting in de situatie. Gezien het primaire karakter van de kindervens lijkt het derhalve wenselijk en verdedigbaar gericht te zoeken naar een eventueel genetische oorzaak van de infertiliteit.

Een onderverdeling kan gemaakt in mannen met infertiliteit zónder dysmorfie, veroorzaakt door chromosoomafwijkingen of genmutaties en syndromale aandoeningen, waarbij genmutaties gepaard gaan met infertiliteit.

Bij oligozoöpermie en niet-obstructieve azoöpermie zijn deleties van Yq in de belangstelling (28,29,30,31), AZF (Azoöpermie Factor)a, AZFb, AZFc, YRRM(Y chromosome RNA recognition motif) 1, YRRM2, DAZ. Deze deleties worden ongeveer in 4% bij mannen met azoö- of oligozoöpermie aangetroffen en altijd aan mannelijke nakomelingen worden doorgegeven met als gevolg infertiliteit, tenzij een mozaïek aanwezig is.

Een andere belangrijke oorzaak, bij congenitale bilaterale vas deferens agenesie (CBVDA) (32), maar ook bij de unilaterale vorm (33), berust op één of meer mutatie(s) (± 700 zijn bekend) in het gen voor cystische fibrose (CF) op chromosoom 7 (7q31). Indien de man een aangeboren obstructieve azoöpermie heeft bestaat een stringente indicatie voor CF mutatie-analyse en eventueel ook bij de vrouw, vanwege de kans op CF bij kinderen.

De meeste syndromen die samenhangen met mannelijke infertiliteit (Tabel II) zijn relatief zeldzaam. Het frequentere optreden van chromosomale stoornissen bij mannen met verminderde spermakwaliteit (9) is een reden om chromosoomonderzoek en gerichte mutatie-analyse te doen alvorens met ICSI/MESA/TESE te behandelen.

Een adequaat advies door een klinisch geneticus en stamboom analyse dient een wezenlijk deel uit te maken van de ICSI-procedure vanwege de eventuele consequenties voor het nageslacht.

Populatiestudies van IVF- en ICSI-patiënten

Een chromosomale oorzaak van de mannelijke infertiliteit met extreme oligozoöpermie en azoöpermie kan door toepassing van ICSI, MESE en TESE, waardoor in de meest extreme gevallen vaak nog zaadcellen gevonden worden voor microinjectie, leiden tot een ongebalancheerde chromosoomafwijking bij het nageslacht. Dit kan of een spontane abortus of de geboorte van een kind met mentale retardatie en multiple lichamelijke afwijkingen veroorzaken. Mede omdat chromosomale oorzaken bekend zijn bij in/subfertiliteit is cytogenetisch onderzoek geïndiceerd van alle mannen die via ICSI +/- MESE/TESE een infertiliteitsbehandeling ondergaan. Tevens is onderzoek geïndiceerd naar frequent voorkomende mutaties in AZF, DAZ of CF genen i.v.m. hun rol bij de oorzaak van infertiliteit. Er zijn nog weinig ICSI-populaties op deze wijze onderzocht, mede wegens kostenaspecten van dit onderzoek.

Tabel IV vat studies samen van IVF- en ICSI-paren, inclusief ons hierna beschreven onderzoek. De onderzochte populaties zijn zeer heterogeen wat betreft de indicatiestelling. Zo bestaat de groep van Hens et al.(34) uit IVF-patiënten met tubaire, andrologische, idiopatische, immunologische infertiliteit en endometriose, ook bij Lange (35) is de groep heterogeen. Tubaire infertiliteit eventueel met een andrologische factor is de meestvoorkomende oorzaak bij de beide IVF-populaties. Bij ICSI-patiënten staat de andrologische oorzaak op de voorgrond, de indicatiestelling wordt steeds verder verruimd.

De frequenties van chromosoomafwijkingen verschilt in de studies. Ook worden bij de partners van ICSI-mannen een verhoogde frequentie aan chromosoomafwijkingen gezien in vergelijking tot de normale bevolking. Dit lijkt verwonderlijk daar ICSI vooral bij andrologische indicatie uitgevoerd wordt. Volgens Skakkebak (36) en Healy (37) komen vaker chromosomale afwijkingen bij infertiele mannen dan bij infertiele vrouwen voor.

Een oorzaak voor de verschillen tussen de studies in tabel IV ligt in het aantal en de selectie

van de onderzochte patiënten. Zowel de absolute grootte van een onderzochte populatie als het aantal onderzochte metafases hebben een directe invloed op de kans een zeldzame afwijking of een laagfrequent mozaïek (<10%) aan te treffen. Zo wordt bijvoorbeeld bij Lange (35) en Mau (38) geen enkele geslachtschromosomale stoornis bij de man of vrouw gevonden die in alle metafases aanwezig is, in tegenstelling tot de andere studies.

Hens (34), Lange (35) en Toncheva (39) vonden aanwijzingen voor de eventuele betekenis van de verhoogde prevalentie van laagfrequente mozaïeken in IVF-populaties. Voor de interpretatie van de gegevens in tabel IV is het van belang te weten dat de studies van Leygraaf (40), Montag (41) en van der Ven (42) deels dezelfde patiëntenpopulatie betreffen.

Deze onderzoeken laten op basis van de verhoogde frequentie van chromosomale afwijkingen in populaties van infertiele paren ruimte voor de veronderstelling dat niet alleen bij de infertiele man maar ook bij zijn partner een chromosomale stoornis tot de infertiliteit zou kunnen bijdragen.

Montag (41) meent dat een chromosomale stoornis bij de man leidt tot een geringere bevruchtungs- en implantatiekans en zwangerschapspercentage, een stoornis bij de vrouw tot een hoger abortuspercentage. In een recente studie van Meschede et al. (43) werd de betekenis van laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken niet afgedaan als zonder klinische betekenis, maar wel in twijfel getrokken. Bij opnieuw karyotyperen van drie gevallen waarbij een laagfrequent mozaïek werd aangetroffen kon het mozaïek weliswaar worden bevestigd, maar in een lagere frequentie. Dit zou verklaard kunnen worden door de grote variatie (25-150) in het aantal onderzochte metafases.

Het is prematuur op basis van de relatief geringe aantallen afwijkingen uit te gaan van bewezen klinische relevantie van mozaïeken met < 10% afwijkende cellen in perifere lymfocyten.

Chromosomale oorzaken zijn van belang bij de infertiliteit van man en vrouw, waarbij de cijfers wisselen, afhankelijk van de patiënten selectie en cytogenetische methodologie. Deze gegevens zijn wel voldoende aanleiding tot het verder opsporen van chromosomale afwijkingen van ICSI-kandidaten en mogelijk ook van paren die door andere oorzaken kinderloos zijn. Tevens is de opsporing van genmutaties (CE, Y-deleties) relevant voor de oorzaak van sub- en infertiliteit en het ICSI-nageslacht.

Frequent voorkomende afwijkende chromosoomafwijkingen bij ICSI-patiënten: Genetisch advies.

Bij Robertsoniaanse en reciproke translocaties bij man of vrouw is er altijd een verhoogde kans op ongebalanceerde chromosoomafwijkingen bij het nageslacht (ongeacht de voortplantingsmethode) en is er een indicatie voor klinisch genetisch advies en verder familieonderzoek.

Bij geslachtschromosomale afwijkingen is bij 45, X (Turner) en 47, XXY (Klinefelter) er veelal een onmogelijkheid om met eigen gameten kinderen te verwekken. Spontane zwangerschappen bij 45,X of 47,XXY individuen zouden berusten op zeldzaam mosaïcisme met bijdrage van een normale cellijn, althans in de kiemcelvorming (44,45). Bij Klinefelters zou er op jong volwassen leeftijd en indien er nog enige spermatogenese is kans op een zwangerschap zijn door de ICSI (46). Daarnaast zijn er voorbeelden van via TESE verkregen zaadcellen van Klinefelter mannen (47), waarmee een klein aantal zwangerschappen verkregen is.

Vrouwen met een 47,XXX karyotype zouden een enigszins verhoogd risico op infertiliteit of zwangerschapsproblemen hebben. Voor het nageslacht blijkt het risico op geslachtschromosomale aneuploidie gering (48,49).

Benet en Martin (50) vonden bij karyotypering van zaadcellen van een 47,XXY man geen verhoogd percentage disomie, met FISH werd dit bij een andere man bevestigd (51). Martini et al.(52) vonden wel bij 2 XYY mannen een verhoogd percentage (8,6%) geslachtschromosomale aneuploidie. Er zouden geen aanwijzingen zijn voor een verhoogd aneuploidie risico bij de nakomelingen van XYY mannen (53).

Overwegingen bij genetisch advies bij geslachtschromosomale mozaïeken

Chromosomale afwijkingen die bij IVF en ICSI paren worden gevonden, bestaan onder andere uit laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken, vooral bij de vrouw. Hierbij is slechts een gering aantal (<10%) van de metafasen afwijkend (Tabel IV). Doorgaans wordt deze bevinding als klinisch niet significant afgedaan.

Met het toenemen van de leeftijd van de vrouw, wordt een hogere frequentie 45,X cellen in de kweek van perifere lymfocyten aangetroffen wordt. Fitzgerald en McEwan (54) toonden aan dat laagfrequente mozaïeken, vooral van geslachtschromosomen, vaker bij vrouwen voor-

komt en leeftijdsafhankelijk is. Nowinski (55) bevestigde dit en vond geen relatie met de reproductieve voorgeschiedenis. Horsman et al.(56) vonden in 16% van een patiëntenpopulatie van vrouwen met habituele abortus een laagfrequent (<10%) mosaïcisme in de perifere lymfocyten. Omdat in de controlekweek van fibroblasten dit percentage niet kon worden bevestigd en het aantal X-aneuploïde cellen niet verschilde in een gematchte controlepopulatie, werd er vanuit gegaan dat deze bevinding geen verklaring zou zijn voor het ontstaan van abortus. Het is mogelijk dat cytogenetische artefacten ontstaan door de wijze van kweken.

Laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken zouden het succes van behandeling met IVF/ICSI kunnen beïnvloeden (39,41). In ons eigen materiaal was de implantatie per embryo in deze subgroep bij vrouwen wel relatief laag, maar niet significant verschillend van vrouwen met autosomale afwijkingen.

Opvallend is dat alleen bij de vrouwen in de onderzochte populaties ICSI-paren laagfrequente mozaïeken werden aangetroffen en niet bij de mannen.

Het is nog niet mogelijk een definitief antwoord te geven op de vraag of laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken klinisch significante effecten hebben op de zwangerschapskans of kans op een geslachtschromosomale afwijking bij de nakomelingen. Wél is bekend dat de kans op een zwangerschap met de leeftijd afneemt. De mediaan van de leeftijd van de vrouwen uit de studies in tabel IV ligt tussen de 30 en 34 jaar, waarmee de leeftijd de verklaring voor het hogere percentage laagfrequente geslachtschromosomale mozaïken kan zijn.

Als bij een vrouw met het Turner fenotype mosaïcisme wordt gevonden dan is er een duidelijk verhoogd risico op abortus (30%), doodgeboorte (7%), abnormale kinderen (20%) en in 7-23% geslachtschromosomale aneuploïdie bij het kind (44).

Klinefelter mannen met een mosaïcisme hebben een verhoogd percentage 24,XY zaadcellen (46). Er zijn echter nog te weinig gegevens bekend om een exacte inschatting van het risico op een XXY kind te geven. Gezien de nieuwe mogelijkheden met de TESE techniek is echter hierbij een verhoogde waakzaamheid geboden en prenataal onderzoek geïndiceerd.

Tabel I. Genetische regulatie van geslachtsdeterminatie en differentiatie

<i>Chromosoom</i>	<i>geslachtsdeterminatie</i>		<i>geslachtsdifferentiatie</i>	
	<i>Locus</i>	<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>Gen</i>
X	Xp21.3	DSS/DAX1?	Xq11.2	Androgen-rec
X	Xq13	XH2		
X	Xp21.2-22.11	SRVX		
Y	Yp11.2	SRY		
1			1p13	3 β HSD 2
2			2q21	LH-rec
2			2p23	SRD5A2
8	8q22.3	?	8p11.2	StAR
9	9p24.1	TDA	9q22	17 β HSD 3
9	9q33	SF1		
10	10q26	?	10q24-25	CYP 17
11	11p13	WT1		
12			12q	AMH-rec
17	17q24.1	SOX-9		
18	18p	?		
19			19p13.3	AMH

(naar Sultan et al, 1997)(57)

SRY:	Sex determining region Y= TDF testis determining factor
XH2:	X-linked helicase 2
SRVX:	X-linked sex reversing factor
SF1:	Steroidogenic factor 1
DSS:	Dosage sensitive sex reversal gen
CYP:	Cytochroom P groep
SOX9:	SRY-related high mobility group box 9
HSD:	HydroxySteroid dehydrogenase
StAR:	Steroidogenic acute regulatory gen
TDA:	Testis determining autosomal trait
DAX1:	DSS-AHC Region on Human X Chromosome, Gene 1
SRD5A2:	Steroid 5 α reductase 2 deficiëntie
AMH:	Anti-Müllerian hormoon

Tabel II. Overzicht van een aantal syndromen in samenhang met mannelijke in/subfertiliteit

<i>Syndroom</i>	<i>Chromosoom/locus</i>	<i>Overerving</i>
Structurele/numerieke chromosomale afwijkingen		
Klinefelter	XXY	-
XX man	XX	-
Mixed gonadale dysgenese	46,XY 45X/46,XY	
Translocaties	Zie tabel III	
Hypothalamus/Hypofyse/adrenale-gonadale as		
Kallman	Xp22.3	X-linked
Prader Willi	15q11q13 mutatie/deletie	
Bioinactief LH	19q13.2-13.32?	
Bioinactief FSH	11pter-p11.2	
Bioinactief LH-rec	2p21	
Androgen insensitivity	Xq11-13	X-linked recessief
Albright's hereditary osteodystrophy	20	Autosomaal dominant
3βHSD type II	1p13.1	
5α reductase deficiëntie	2p23	Autosomaal recessief
17α Hydroxylase deficiëntie	10q24-25	Autosomaal recessief
17β Hydroxylase deficiëntie type III	9	Autosomaal recessief
Polyglandular failure I	21q22.3	Autosomaal recessief?
Congenitale adrenale hypopl.	Xp21	X-linked recessief
Hanhart	17q22-24	Autosomaal recessief/X-linked rec.
Hutchinson Gilford Progeria	1	Autosomaal dominant
Ductale systeem/anejaculatie		
Persistent müllerian duct	Hormoon 19p13.2-13.3 Receptor 12q13	Autosomaal recessief
Young (obstr.epididymis)		Autosomaal recessief
Vas def. agenesie/Cystic Fibrose	CFTR-locus	Autosomaal recessief
Myelodysplasie (spina bifida)		Multifactorieel sporadisch
Prune belly sequentie		Autosomaal dominant
Fanconi anaemie	16q24.3, 9q22.3, 3p	Autosomaal recessief
Robinow		Autosomaal recessief/dominant
Rothmund Thomson		Autosomaal recessief
Russell Silver	17q25	Autosomaal recessief/ X-linked dom.
Sperma productie/functie		
AZF/DAZ	Yq11.23	Y-linked
Primary ciliaire dyskinesie		Autosomaal recessief
Noonan	12q22-qter	Autosomaal dominant
Nonne Milroy Meige		Autosomaal dominant
Gorlin	9q	Autosomaal dominant
Leopard	22q11.2	Autosomaal dominant
Treacher-Collins	5q	Autosomaal dominant
Neurofibromatosis	17p	Autosomaal dominant
Neurofibromatosis-Noonan		Autosomaal dominant
Opitz	22q11.2 / Xq	Autosomaal dominant/X-linked dom.
Rieger	13q14 / 4q	Autosomaal dominant
Shprintzen	22q18	Autosomaal dominant
Aarskog-Skott	Xp11.21	X-linked recessief
Kennedy disease	Xq11-12	X-linked-recessief
Myotone dystrofie	19q13.3	Autosomaal dominant
Adreno myelo neuropathie	Xq28	X-linked recessief
Kearns Sayre	Mitochondrial DNA	Mitochondrieel
Beckwith Wiedemann	11p15.5	Autosomaal dominant
Bardet Biedl	3q 11q 15q 16q	Autosomaal recessief
9+0 axonemal defect		Autosomaal recessief
Globozoospermie		Autosomaal recessief?
Werner	8p12-p11.2	Autosomaal recessief

Samengesteld uit Fauser(27), Meschede(58), Oates(59), Vogt(60,61).

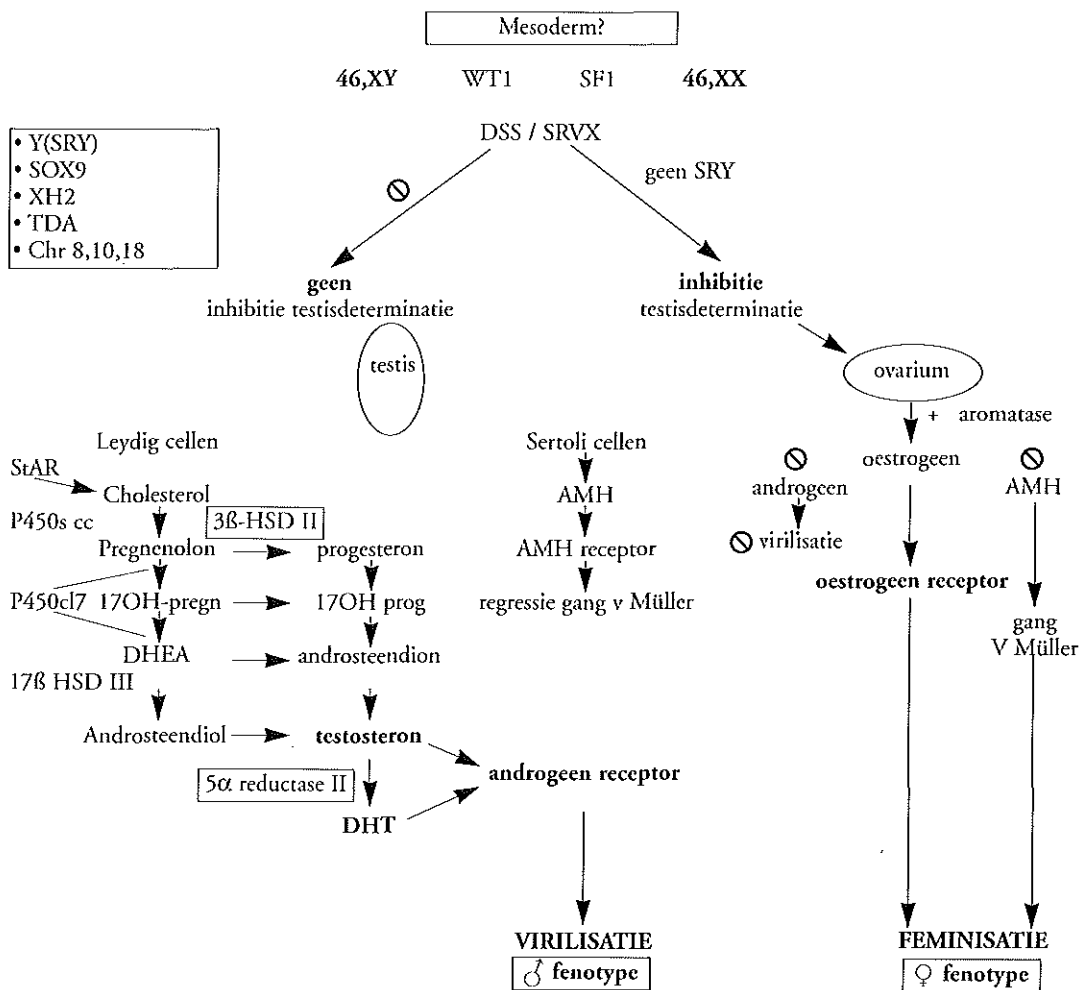
Gedetailleerde informatie: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Tabel III. Translocaties waarbij melding van mannelijke infertiliteit gemaakt werd

Specificatie translocaties

T(1;9)(p32.1;q34.3)	t(9;17)(p11;q11)
T(1;16) (q22;p12)	t(9;20)(q34;q11)
T(1;16) (q23;p13)	t(11;15)(q25-qter;pter),-11,-15
T(1;18)(p31.2;q23)	t(13;14)
T(1;19)(p13;q13)	t(13q15q)
T(2;4;8)(q23;q27;p21)	t(14;21)(q13;p13)
T(3;4)(p25;q21.3)	t(14;22)(p11;q11.1)
T(3;5)(q29;q14)	t(17;21)(p13;q11)
T(3;5)(p12;q34)	t(19;22)(13.1;q11.1)
T(3;14) (q27;q11)	t(Y;1)(q12;p34.3)
T(3;20) (q11;p13)	t(Y;3) (q12;p21)
T(4,6)(q26;q27)	t(Y;11)(q11.2;q24)
T(4;13)(q11;q12.3)	t(X;Y)
T(9;12;13)	t(X;Y)(p22.3;q11)
T(9;15)(p22;q15)	
<i>(naar Oates,1996)(59).</i>	

Fig 1. Flowdiagram sex determinatie en differentiatie. (naar Sultan et al, 1997)(57)



SRY: Sex determining region Y = TDF testis determining factor

XH2: X-linked helicase 2

SRVX: X-linked sex reserving factor

SF1: Steroidogenic factor 1

DSS: Dosage sensitive sex reversal gen

CYP: Cytochrome P groep

SOX9: SRY-relates high mobility group box 9

HSD: HydroxySteroid dehydrogenase

StAR: Steroidogenic acute regulatory gen

TDA: Testis determining autosomal trait

SRD5A2: Steroid 5α reductase 2 deficientie

AMH: Anti-Müllerian hormoon

DHT: Dihydrotestosteron

Tabel IV. Overzicht van geslachtschromosomale en autosomale afwijkingen in IVF en ICSI populaties

<i>Auteur</i>	<i>N</i>	<i>M/V</i>	<i>Afw. in alle metafasen</i>		<i>Mozaïek</i>	
			<i>gesl. chr.</i>	<i>autosoom</i>	<i>gesl. chr.</i>	<i>autosoom</i>
			<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
Hens ^a	500	M	0,2	0,6	-	-
1988 ⁽³⁴⁾	500	V	0,4	0,6	0,8	-
Lange ^a	72	M	-	2,7	-	-
1993 ⁽³⁵⁾	72	V	-	-	15,2	-
Testart ^b	261	M	0,38	3,83	nv	nv
1996 ⁽⁶²⁾	261	V	-	1,14	nv	nv
Mau ^b	150	M	-	7,3	4,6	nv
1997 ⁽³⁵⁾	150	V	-	2	4	nv
Leygraaf ^b	175	M	-	2,8	3,42	1,7
1997 ⁽⁶⁰⁾	175	V	0,57	3,42	8,57	2,8
Montag ^b	434	M	0,46	1,38	0,92	2,99
1997 ⁽⁴¹⁾	434	V	-	1,84	5,52	5,29
Vd Ven ^b	305	M	0,65	2,62	nv	nv
1998 ⁽⁴²⁾	305	V	0,32	2,95	nv	nv
Meschede ^b	432	M	-	1,38	0,46	0,23
1998 ⁽⁴³⁾	436	V	-	0,91	4,35	0,22
Scholtes ^b	1116	M	0,71	2,95	0,8	nv
1998	1164	V	0,17	2,3	7,3	nv

a IVF patiënten, gemengde indicaties

b ICSI patiënten

nv= niet vermeld

DEEL 2

Chromosomale afwijkingen bij ICSI-patiënten: Invloed op implantatie en doorgaande zwangerschappen.

(bewerkt naar oorspronkelijk artikel Fertil Steril 1998, ter perse. Chromosomal aberrations in ICSI couples: Influence on implantation and ongoing pregnancy rate. Scholtes MCW, Behrend C, Dietzel-Dahmen J, van Hoogstraten DG, Marx K, Wohlers S, Verhoeven H, Zeilmaker GH.)

Samenvatting

Deze prospectieve studie werd opgezet om het vóórkomen van chromosomale afwijkingen en de invloed daarvan op de fertiliteit te onderzoeken bij paren die in aanmerking kwamen voor ICSI. Als eindpunt werd de implantatie per embryo en het aantal doorgaande zwangerschappen of partus genomen. Deze studie werd uitgevoerd in het IVF centrum Düsseldorf.

In een groep van 2280 probandi werd cytogenetisch onderzoek verricht. Bij alle patiënten werden minstens 10 metafasen gescreend, de geslachtschromosomen werden in nog eens 10 extra metafasen geanalyseerd. In het geval dat er aanwijzingen waren dat mogelijk een aberratie aanwezig was werd het aantal metafasen uitgebreid tot 100. Indien slechts een afwijking werd gezien bij één cel op de 100, dan werd deze bij de analyse niet als afwijking geclassificeerd.

Bij 6,3% van alle paren werd een chromosomale afwijking vastgesteld.

Bij de mannelijke probandi werd in 3,75% een afwijking gevonden. Autosomale afwijkingen stonden bij mannen met 2,23% op de voorgrond, gevolgd door 1,52% numerieke of structurele geslachtschromosomale afwijkingen.

Bij de vrouwelijke probandi werd in 8,76% een afwijking aangetoond. In 1,29% van de vrouwen betrof het een autosomale structurele afwijking. Bij 7,47% van de vrouwelijke probandi kon een numerieke of structurele geslachtschromosomale anomalie worden vastgesteld.

Bij vrouwen met een geslachtschromosomale afwijking was het implantatiepercentage per embryo 9,4%. Het percentage doorgaande zwangerschap of geboorte 12,5% per ET.

Bij vrouwen waar autosomale afwijkingen werden aangetroffen, waren deze percentages 12,2%, respectievelijk 18%.

Bij mannen met een geslachtschromosomale afwijking was de implantatiekans per embryo van het betroffen paar 3,8%, 18% bij een autosomale aberratie, echter statistisch niet significant verschillend.

De incidentie van chromosomale afwijkingen in onze ICSI-populatie blijkt aanzienlijk, laag-frequente mozaïeken (<10% abnormale metafasen) van de geslachtschromosomen werden vooral bij de vrouwen (7,3%) aangetroffen. Bij deze groep wordt een relatief laag implantatiepercentage per embryo (9,4%) gevonden.

Inleiding

Theoretisch verhoogt ICSI de kans om chromosomale afwijkingen door te geven aan de volgende generatie vanwege het gebruik van chromosomaal abnormaal sperma. Dit verhoogde risico treedt met name op bij mannen met een extreme oligozoöspirme (8,63,64,65). Uit de literatuur blijkt echter slechts een licht verhoogd percentage (1,2%) van chromosomale afwijkingen bij ICSI kinderen en geen wezenlijke verhoging van het aantal grote aangeboren afwijkingen (66). Het zou kunnen zijn dat regelmechanismen in de natuur chromosomaal afwijkende embryo's uitselcteren (5,63).

Een analyse van het somatische karyotype van alle eventuele ICSI kandidaten zal mogelijk het risico om chromosomaal abnormale kinderen te krijgen verder kunnen beperken.

Volgens de richtlijnen van de Federale Vereniging van Voortplantingsgeneeskundigen in Duitsland, moeten paren voor het uitvoeren van een ICSI-behandeling gekaryotypeerd worden en genetisch advies krijgen, onafhankelijk van oorzaak van de infertiliteit.

Alle paren die in aanmerking willen komen voor een ICSI behandeling zijn in deze studie opgenomen.

De eerste gegevens over de mogelijke invloed van chromosomale afwijkingen bij deze paren op de implantatie en voortgaande zwangerschap worden besproken.

Materiaal en methoden

Gedurende een periode van 26 maanden werd cytogenetische onderzoek uitgevoerd bij 2280 patiënten (1116 mannen en 1164 vrouwen) die voor ICSI werden verwezen. Een aantal man-

nen was reeds elders gekaryotypeerd. Alle overige cytogenetische analyses werden uitsluitend in het cytogenetisch laboratorium van het IVF centrum Düsseldorf uitgevoerd.

Bij elke patiënt werd een cytogenetisch onderzoek gedaan in perifere lymfocyten en geanalyseerd met trypsine-Giemsa techniek. Bij een structurele afwijking werden aanvullende analyses gedaan zoals: C-banding en NOR kleuring.

In alle gevallen werden 10 metafases gekaryotypeerd; het aantal geslachtschromosomen werd in totaal van 20 metafasen bepaald; bij aanwijzing voor een mozaïek, werden in totaal 100 metafasen uit 2 aparte celkweken onderzocht.

De leeftijd van de mannen was tussen 22-66 jaar (mediaan 34,5 jaar). Van de vrouwen tussen de 19-49 jaar (mediaan 32,5 jaar).

De indicatiestelling voor de ICSI behandeling was in 91% extreme oligo/ astheno/ teratozoöspermie ($< 5.10^6$ spermatozoa/ml, $< 25\%$ progressief beweeglijke zaadcellen, $< 15\%$ normale vormen) en in de overige 9% andere indicaties zoals niet bevruchten of herhaald slechte bevruchtingspercentages bij vorige IVF-behandelingen.

Een andrologische factor werd alleen vastgesteld na herhaald sperma-onderzoek met een interval van 6 weken.

Alle paren met een chromosomale afwijking werden door een klinisch geneticus gecounselled. Familieonderzoek werden in alle gevallen aangeboden.

De statistiek werd uitgevoerd met behulp van chi-kwadraat analyse en Fischer's two tail exact test.

Resultaten

Tijdens de twee jaar van systematische cytogenetische analyse van de ICSI populatie werd bij 2280 probandi, 1164 vrouwen en 1116 mannen, een chromosomaal onderzoek gedaan.

In 6,3% van de paren werd een chromosomale afwijking geconstateerd; bij 8,8% van de vrouwen en 3,75% van de mannen (Tabel I). Bij slechts één afwijkende cel werd dit niet als abnormaal beschouwd.

In de groep mannelijke probandi werden 3,75% afwijkingen gevonden, autosomale afwijkingen stonden met 25 (2,23%) op de voorgrond, met 17 (1,52%) numerieke of structurele afwijkingen van de geslachtschromosomen op de tweede plaats (Tabel II).

Bij de vrouwelijke probandi werden numerieke of structurele afwijkingen in 8,76% vastge-

steld, waarvan 15 (1,29%) berustten op autosomale afwijkingen en 87 (7,47%) op de geslachtschromosomen (Tabel III). De laatste waren meestal een laag frequent mozaïek.

Een relatie van de leeftijd van de vrouw met het vóórkomen van geslachtschromosomale afwijkingen kon in deze populatie niet worden aangetoond.

In slechts 2 paren hadden beide partners een afwijkend karyotype. In het ene geval had de man een Klinefelter syndroom en zijn partner een 45,X/47,XXX/46,XX (2%, 2%, 96%) mozaïek. In het andere geval hadden beide partners een laagfrequent mozaïek: 47,XYY/46,XY (4%, 96%) en 45,X/46,XX (5%, 95%).

Gegevens betreffende de aard van mannelijke en vrouwelijke autosomale afwijkingen en verdere specificatie van de anomalieën kunnen in tabel IV-VI worden teruggevonden.

Bij de 54 vrouwen met een geslachtschromosomale afwijking (inclusief mozaïken) bedroeg het implantatiepercentage per embryo 9,4% en het percentage voortgaande zwangerschappen c.q. geboorten 12,5%, bij autosomale afwijkingen (n=12) respectievelijk 12% en 18%.

Bij de 9 mannen met geslachtschromosomale afwijkingen werd een implantatiepercentage per embryo van 3,8% gezien, 18% als de man een autosomale afwijking (n=25) vertoonde (n.s). Ter vergelijking werd retrospectief over een ongeselecteerde groep ICSI-patiënten zonder chromosomale afwijkingen het implantatiepercentage berekend. Van 2862 embryo's bij 1206 plaatsingen implanteerden (hartactie+) er 344 (12%).

**Tabel I. Cytogenetische analyse van 2280 ICSI patiënten:
1164 vrouwen en 1116 mannen**

<i>Karyotype</i>	<i>Vrouw</i>		<i>Man</i>	
	<i>n</i>	<i>%*</i>	<i>n</i>	<i>%*</i>
Normaal	1062	91,24	1074	96,25
Afwijking		8,76		3,75
Autosomen numeriek			3	0,26
Autosomen structureel†	15	1,29	22	1,97
Geslachtschromosomen numeriek	85	7,3	15	1,34
Geslachtschromosomen structureel	2	0,17	2	0,18

* percentages van respectievelijk alle vrouwen of mannen.

† exclusief pericentrische inversie van chromosoom 9: bij de vrouw(n=12), bij de man(n=8)

**Tabel II. Cytogenetische analyse van 1116 mannelijke probandi:
geslachtschromosomale afwijkingen**

<u>Numeriek</u>		<i>n(%)</i> *
Compleet	47,XXY	3(0,27%)
	47,XYY	3(0,27%)
Mozaïek	47,XXY/46,XY	2(0,18%)
	47,XYY/46,XY	3(0,27%)
	47,XYY/49,XYYYY/46,XY	1(0,09%)
	47,XYY/45,X	1(0,09%)
	45,X/46,XY	2(1,18%)
<u>Structureel</u>		
Compleet	46,X,parac inv(Y)(q11.2q12)	1(0,09%)
	46,X,peric inv(Y)(p11.2q12)	1(0,09%)
Mozaïek		0

** tussen haakjes: percentages van alle mannen.*

**Tabel III. Cytogenetische analyse van 1164 vrouwelijke probandi:
geslachtschromosomale afwijkingen**

<u>Numeriek</u>		<i>n(%)</i> *
Compleet	47,XXX	1(0,08%)
Mozaïek	45,X/46,XX	48(4,12%)
	47,XXX/46,XX	7(0,6%)
	45,X/47,XXX/46,XX	22(1,89%)
	45,X/48,XXXX/46,XX	4(0,34%)
	45,X/47,XXX/48,XXXX/46,XX	2(0,17%)
	45,X/47,XXX/48,XXX/49,XXXXX/46,XX	1(0,08%)
<u>Structureel</u>		
Compleet	46,X,dcl(X)(pter->q22:)	1(0,08%)
Mozaïek	46,Xr(X)/46,XX	1(0,08%)

** tussen haakjes: percentages van alle vrouwen.*

Tabel IV. Cytogenetische analyse bij 1116 mannelijke ICSI probandi: autosomale afwijkingen

<u>Numeriek</u>		<i>n(%)*</i>
Marker-chromosomen	47,XY,+mar (onbekende oorsprong)	1(0,09%)
	47,XY,+dic (15)(q11)	1(0,09%)
	47,XY,+ i (13)(pter->p10)	1(0,09%)
<u>Structureel</u>		
Translocaties	Robertsoniaanse translocaties	
	- der(13;14) (q10;q10)	8(0,72%)
	- der(14;21) (q10;q10)	2(0,18%)
	- der(14;15) (q10;q10)	1(0,09%)
	reciproke translocaties (zie Tabel VI.)	9(0,8%)
Inversies	Paracentrisch (zie Tabel VI.)	2(0,18%)
	Pericentrisch	
Duplicaties		0

** tussen haakjes: percentages van alle mannen.*

Exclusief pericentrische inversie van chromosoom 9 bij 8 mannen.

Tabel V. Cytogenetische analyse bij 1164 vrouwelijke ICSI probandi: autosomale afwijkingen

<u>Numeriek</u>		<i>n(%)*</i>
Marker-chromosomen	47,XX,+mar	0
<u>Structureel</u>		
Translocaties	Robertsoniaanse translocaties	0
	Reciproke translocatie (zie Tabel VI.)	8(0,69%)
Inversies	paracentrisch (zie Tabel VI.)	2(0,12%)
	pericentrisch (zie Tabel VI.)	3(0,26%)
Duplicaties	46,XX,dup(9)(q21.1q21.2)	1(0,08%)
	46,XX,dup(9)(p12p12)	1(0,08%)

** tussen haakjes: percentages van alle vrouwen.*

Exclusief pericentrische inversie van chromosoom 9 bij 12 vrouwen.

Tabel VI. Gedetailleerde lijst van 37 structurele autosomale afwijkingen bij 2280 ICSI probandi

vrouw

Reciproke translocaties

46,XX,t(12;16)(q24.3;p11.2)

46,XX,t(2;20)(q14.3;p13)

46,XX,t(12;19)

46,XX,t(1;2)(q42;p11.2)

46,XX,t(1;8)(p10;q10)

46,XX,t(7;9)(p10;p10)

46,XX,t(3;13)(q21;q22)

46,XX,t(2;7)(p25;q22)

Inversies paracentrisch

46,XX,inv(7)(p15.1p22)

46,XX,inv(12)(q21q23)

Inversies pericentrisch

46,XX,inv(10)(p11.2q21.2)

46,XX,inv(10)(p11q22)

6,XX,inv(10)(p11q22)

Duplicaties

46,XX,dup(9)(q21.1q21.2)

46,XX,dup(9)(p12p12)

Exclusief pericentrische inversie van chromosoom 9(n=20).

man

Reciproke translocaties

46,XY,t(1;9)(q44;p11.2)

46,XY,t(4;11;18)(p12;p15.1;q23)

46,XY,t(3;10)(p25;q26)

46,XY,t(1;3)(p36.5;q21)

46,XY,t(8;13)(q24.1;q22)

46,XY,t(9;14)(p22;q22)

46,Y,t(X;3)(q26;q23)

46,XY,t(4;19)(q34;q13.3)

46,XY,t(6;18)(q26;q23)

Inversies paracentrisch

46,XY,inv(3)(p21p25)

46,XY,inv(2)(q21q22)

Robertsoniaanse translocaties(n=11)

- der(13;14) (q10;q10)

- der(14;21) (q10;q10)

- der(14;15) (q10;q10)

Tabel VII.

Onderverdeling van chromosomale afwijkingen naar mannelijke/vrouwelijke geslachts-chromosomale of autosomale anomalie: invloed op de implantatie en zwangerschap

<i>Aberratie</i>	<i>N</i>	<i>N cycli</i>	<i>N zwangerschap/</i>	<i>Implantatie/</i>	<i>N doorgaandel of</i>	<i>Prenatale</i>
	<i>patiënten</i>	<i>(n ET)</i>	<i>(%/ET)</i>	<i>embryo†</i>	<i>partus(€/ET)</i>	<i>anomalie ∂</i>
<i>Man</i>						
Geslachtschromosomen 9		14(12)	1(8.3)	3,8%§†	0/1(8,3)	-
Autosomen	25	37(30)	7(23)	18%§†	0/8(27)	2†
<i>Vrouw</i>						
Geslachtschromosomen 54		94(72)	13(18)	9,4%*	2/7(12,5)	-
Autosomen	12	24(17)	4(23)	12%*	0/3(18)	-

§ * niet significant. (Fischer's t-test, $p > 0.05$)

∂ genapporteerde chromosomale afwijking. † 1 selectieve fetocide (trisomie 9), 1 gebalanceerde rob(13;14)

† indien pericentrische inversie van chromosoom 9 meegerekend zou worden, dan $p < 0,05$.

Discussie

Chromosomale afwijkingen bij infertiliteit van de man worden met name gevonden als de spermatogenese gestoord is (8,63,64,66,67,68,69).

Bij ICSI wordt ernaar gestreefd zo mogelijk normaal ogende spermatozoa te gebruiken. Dit biedt geen garantie op een normale chromosomale samenstelling van de zaadcel, omdat werd aangetoond dat de morfologie geen graadmeter voor chromosomale normaliteit is (70).

Grootschalige studies van numerieke chromosoomafwijkingen in menselijke zaadcellen werden mogelijk door FISH (13,71,72,73,74). De steekproef uit de zaadcelpopulatie kan met deze techniek groter zijn, omdat deze onafhankelijk is van al of niet chromatinedecondensatie (zoals bij de hamster eiceltest). Omdat de analyse interfasekernen bekijkt, is er geen onderscheid tussen levend of dood materiaal, bewegelijke of onbewegelijke, morfologisch normale en afwijkende zaadcellen. Een voordeel van karyotypering in vergelijking met FISH is de kleuring van alle chromosomen en alle structurele afwijkingen.

De frequentie van een abnormale chromosomale constitutie is niet automatisch hetzelfde in de populatie gameten die voor de micro-injectie geselecteerd worden.

Er zijn aanwijzingen dat tijdens de meiose van de spermatogenese eerder non-disjunctie van chromosomen bij het geslachtschromosoom en chromosoom 21 op zou treden (13,75).

Een samenhang tussen infertiliteit en chromosomale afwijkingen werd reeds eerder in verschillende IVF-patientengroepen vermoed (34,35). Gegevens over het voorkomen van geslachtschromosomale afwijkingen zijn controversieel, het aantal observaties bij IVF-patienten is beperkt. De mogelijkheid bestaat verder dat de indicatie voor de IVF kan samenhangen met geslachtschromosomale afwijkingen.

Door de introductie van de ICSI is het besef gegroeid dat de mogelijkheid reëel aanwezig is dat deze methoden bijdragen aan het doorgeven van chromosomale afwijkingen aan de volgende generatie (76). Numerieke en structurele chromosomale afwijkingen kunnen bij ICSI tot bevruchting leiden (43,62). Een complexe structurele afwijking lijkt onverenigbaar met een bevruchting, ook door ICSI (77).

Door cytogenetisch onderzoek van abortusmateriaal konden Burgoyne et al.(78) vaststellen dat van 20% numerieke chromosomale afwijkingen bij de conceptie uiteindelijk maar 0,53% bij de geboorte (dood- en levend) overblijft. Een natuurlijke selectie van embryo's beperkt de transmissie van chromosomale afwijkingen (5).

Studies over het voorkomen van chromosomale afwijkingen bij ICSI-patiënten hebben door-

gaans geen normale controlegroep. Het zou zinvol zijn prospectief een controlegroep te vormen, omdat in het verleden laagfrequente mozaïeken als kweek-artefact werden gezien of als klinisch onbelangrijk buiten beschouwing werden gelaten.

In 't Veld et al.(79) adviseert cytogenetisch onderzoek en counselling van mannen met een idiopathische oligozoöpermie of azoöpermie alvorens ICSI behandeling overwogen wordt.

In Duitsland moet volgens de richtlijnen bij de uitvoering van ICSI bij de betrokken kandidaten, man én vrouw, een cytogenetisch onderzoek plaatsvinden vóór de start van de behandeling, onafhankelijk van de oorzaak van de infertiliteit.

Onze studie bevestigt dat chromosomale afwijkingen in een hoog percentage vóórkomen bij zowel mannen en vrouwen in een ICSI-populatie.

Het opvallend hoge percentage chromosomale afwijkingen in de groep vrouwelijke ICSI patiënten in deze studie werpt de vraag op of een verhoogde incidentie mogelijk ook in het algemeen voorkomt bij infertiele paren zoals al eerder opviel bij mannelijke en vrouwelijke patiënten die een normale IVF-behandeling ondergingen (34).

Er is een hoge incidentie geslachtschromosomale aneuploïdie bij de vrouwelijke ICSI-patiënten aanwezig, waarbij 45,X metafases frequenter worden aangetroffen dan 47,XXX cellen (80). Het verlies van een X-chromosoom is leeftijdsafhankelijk en werd verklaard met prematuur splijten van de centomeren, die niet aan spoeldraden vastzitten en als zodanig non-disjunctie veroorzaken (54,81,82), zowel in de oöcyt als in somatische cellen.

In ons ICSI-materiaal kon geen samenhang tussen leeftijd en het voorkomen van 45,X/46,XX mozaïcisme vastgesteld worden, ten gevolge van de geringe spreiding van de leeftijd van de vrouwen. Het is mogelijk dat het aantreffen van een verhoogd percentage laag frequente geslachtschromosomale mozaïeken bij deze vrouwen een leeftijdseffect is (mediaan 32,5 jr). Deze gegevens moeten voorzichtig geïnterpreteerd worden, omdat het karyotype van perifere lymfocyten niet automatisch naar de kiemcellijn geëxtrapoléerd mag worden.

Het blijft natuurlijk de vraag of deze verhoogde incidentie van laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken mede voor het bestaan van infertiliteit, cyclusstoornissen, problemen bij de implantatie en de verdere ontwikkeling van de zwangerschap verantwoordelijk kunnen zijn. Een zekere maternale predispositie voor chromosomale aneuploïdie zou bij IVF-patiënten voorkomen en kunnen leiden tot mislukte IVF-cycli (83).

Geen statistisch significant verschil kon in ons materiaal aangetoond worden voor de implantatie per embryo afkomstig van vrouwen en mannen met een geslachtschromosomale- of met een autosomale afwijking. Weliswaar is de groep waarbij een zwangerschap optrad nog te klein

voor een definitieve uitspraak. Verdere uitbreiding van het materiaal is daarom nodig. Bij kinderen geboren na ICSI is het percentage autosomale afwijkingen niet verhoogd. De incidentie van geslachtschromosomale afwijkingen is met 1,2% (66) hoger dan in een ongeselecteerde populatie ($\pm 0,3\%$)(84,85). Bij onderzoek naar de verklaring voor de verhoogde incidentie van geslachtschromosomale afwijkingen bij de nakomelingen na ICSI behandeling, dienen paternale en maternale oorzaken beiden onderzocht te worden.

Derhalve is chromosomaal onderzoek van zowel man als vrouw vóór een ICSI-behandeling geïndiceerd.

Referenties

1. Van Blerkom J, Henry G. Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbations in chromosomal organization and complement. *Hum Reprod* 1988;3:777-90.
2. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;7:379-90.
3. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12: 1267-70.
4. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-13.
5. Plachot M, Veiga A, Montagut J, de Grouchy J, Calderon G, Lepretre S, Junca AM, Santalo J, Carles E, Mandelbaum J, et al. Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Reprod* 1988;3: 627-35.
6. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd edn. Cambridge University Press, 1992 Cambridge, UK.
7. Chandley AC, Edmond P, Christie S et al. Cytogenetics and infertility in man. *Ann Hum Genet* 1975;39:231-52.
8. Retief AE, van Zyl JA, Menkveld R, Fox ME, Kotze GM, Brunsnicky J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1984;66:162-4.

9. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6:245-50.
10. Rudak E, Jacobs P, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978;274:911-13.
11. Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 1990;27:200-8.
12. Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1990;46:553-8.
13. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: the use of multi-color FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 1996;58:356-62.
14. Martin RH, Ko E, Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 1991;39:321-31.
15. Guttenbach M, Martinez Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997;12:468-73.
16. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1995;64:811-7.
17. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization(FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441-52.
18. Hassold T, Sherman S. The origin of non-disjunction in humans. In *Chromosomes Today*, Sumner A, Chandley A Eds., Chapman and Hall, London 1993;p 313-22.
19. Antonarakis S. The Down Syndrome Collaborative Group: Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1991;324:827-76.
20. Fisher JM, Harvey JF, Lindenbaum RH, Boyd PA, Jacobs PA. Molecular studies of trisomy 18. *Am J Hum Genet* 1993;52:1139-44.
21. Zaragoza MV, Jacobs PA, James RS, Rogan P, Sherman S, Hassold T. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum Genet* 1994;94:411-7.
22. MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of

- 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet* 1994;3:1365-71.
23. Jacobs PA, Betts PR, Cockwell AE, Crolla JA, Mackenzie MJ, Robinson DO, Youings SA. A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann Hum Genet* 1990;54:209-23.
 24. Ogata T, Matsuo N. Testis determining gene(s) on the X chromosome short arm: chromosomal localisation and possible role in testis determination. *J Med Genet* 1994;31:349.
 25. Foster J, Hawkins R. The genetics of gonadal differentiation. In *Topical Endocrinology* Chapterhouse Codex Ltd Edit., Hampshire, 1996;3:7-10.
 26. Simpson J. Genetics of infertility. Abstr. Treatment of infertility: the new frontiers. Boca Raton, Florida, USA. 22-24 Jan. 1998:OR-4.
 27. Fauser BCJM, Hsueh AJW. Genetic basis of human reproductive endocrine disorders. *Hum Reprod* 1995;10:826-46.
 28. Tiepolo L, Zuffardi O. Localisation of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human chromosome Y long arm. *Hum Genet* 1976;34:119-24.
 29. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992;89:491-6.
 30. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, McBeath S, Chandley AC. Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992;1:29-33.
 31. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996;347:1290-3.
 32. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992;267:1794-7.
 33. Mickle J, Milunsky A, Amos JA, Oates RD. Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod* 1995;10:1728-35.
 34. Hens L, Bonduelle M, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC. Chromosome aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum Reprod* 1988;3:451-7.

35. Lange R, Johannson G, Engel W. Chromosome studies in in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 1993;8: 572-4.
36. Skakkebaek NE, Giwercman A, de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 1994;343:1473-9.
37. Healy DL, Trounson AO, Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 1994;343:1539-44.
38. Mau UA, Bäckert IT, Kaiser P, Kiesel L. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:930-7.
39. Toncheva D, Ilieva P, Mavrudieva M. Detection of low level sex-chromosomal mosaicism. *Genet Couns* 1994;5:363-7.
40. Leygraaf J, Peschka B, van der Ven K, van der Ven H, Schwanitz G. Die Häufigkeit chromosomaler Auffälligkeiten bei Ehepaaren vor Behandlung durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). *Fertilität* 1997;13:150-4.
41. Montag M, van der Ven K, Ved S, Schmutzler A, Priel G, Krebs D, Peschka B, Schwanitz G, Albers P, Haidl G, van der Ven H. Success of intracytoplasmic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations. *Hum Reprod* 1997;12: 2635-40.
42. Van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven H. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:48-54.
43. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, de Geyter Ch, Behre HM, Nieschlag E, Horst J. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic injection: prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod* 1998;13:576-82.
44. Kaneko N, Kawagoe S, Hiroi M. Turner's syndrome--review of the literature with reference to a successful pregnancy outcome. *Gynecol Obstet Invest* 1990;29:81-7.
45. Terzoli G, Lalatta F, Lobbiani A, Simoni G, Colucci G. Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril* 1992;58:821-2.
46. Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Benitz V, Jalbert H, Sele B. Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet* 1994;93:32-4.

47. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M, Van Steirteghem A. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 1996;11:1644-9.
48. Neri G. A possible explanation for the low incidence of gonosomal aneuploidy among the offspring of triplo-X individuals. *Am J Med Genet* 1984;18:357-64.
49. Hale DW. Is X-Y recombination necessary for spermatocyte survival during mammalian spermatogenesis? *Cytogenet Cell Genet* 1994;65:278-82.
50. Benet J, Martin RH. Sperm chromosome complements in a 47,XYY man. *Hum Genet* 1988;78:313-5.
51. Han TH, Ford JH, Flaherty SP, Webb GC, Matthews CD. A fluorescent in situ hybridization analysis of the chromosome constitution of ejaculated sperm in a 47,XYY male. *Clin Genet* 1994;45:67-70.
52. Martini E, Geraedts JP, Liebaers I, Land JA, Capitanio GL, Ramaekers FC, Hopman AH. Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:1638-43.
53. Stoll C, Flori E, Clavert A, Beshara D, Buck P. Abnormal children of a 47,XYY father. *J Med Genet* 1979;16:66-8.
54. Fitzgerald PH, McEwan CM. Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women. *Hum Genet* 1977;39:329-37.
55. Nowinski GP, van Dyke DL, Tilley BC, Jacobsen G, Ramesh Babu V, Worsham MJ, Wilson GN, Weiss L. The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am J Hum Genet* 1990;46:1101-11.
56. Horsman DE, Dill FJ, McGillivray BC, Kalousek DK. X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Gene* 1987;28:981-7.
57. Sultan C, Lumbroso S, Poujol N, Lobaccaro JM. The molecular genetics and endocrinology of sexual differentiation. In: *Genetics of human male fertility*. Eds Barratt C, De Jonge C, Mortimer D, Parinaud J. 1997 Paris, France :1-10.
58. Meschede D, Horst J. The molecular genetics of male infertility. *Mol Hum Reprod* 1997;3: 419-30.
59. Oates RD. Genetics of male subfertility: which subfertile men need evaluation for what.

- In:Male reproduction for the year 2000:state of the art considerations. 29th annual post-graduate program ASRM. Boston, Massachusetts, november 2-3, 1996;p 45-67.
60. Vogt PH. Molecular basis of male (in)fertility. *Int J Androl* 1997;20 Suppl.3:2-10.
 61. Vogt PH. Genetic aspects of artificial fertilization. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl.1:128-37.
 62. Testart J, Gautier E, Bami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:2609-12.
 63. Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M. Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet* 1975;39:231-54.
 64. Chandley AC. The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull* 1979;35:181-6.
 65. Ferguson-Smith MAB, Lennox WS, Mack JSS, Steward. Klinefelter's syndrome:frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet* 1957;2:167-9.
 66. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11 Suppl 4:131-55.
 67. Pandiyan N, Jequier AM. Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile man. *Human Reprod* 1996;11:2604-8.
 68. Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P. Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1985;71:366-7.
 69. Bourrouillou G, Calvas P, Bujan L, Mieusset R, Mansat A, Pontonnier F. Mitotic chromosomal anomalies among infertile man. *Human Reprod* 1997;12:2337-8.
 70. Martin R, Rademaker A. The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mut Res* 1988;207:159-164.
 71. Martin RH, Ko E, Chan K. Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet.* 1993;64:23-6.
 72. Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ. Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am J Hum Genet* 1993;52:799-807.
 73. Martin RH, Spriggs E, Rademaker AW. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225,846 sperm from 10 normal men. *Biol Reprod* 1996;54:394-8.

74. Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997;3:585-98.
75. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X, and Y. *Cytogenet Cell Genet* 1995;7:47-53.
76. Engel W, Murphy D, Schmid M. Are there genetic risks associated with microassisted reproduction? *Human Reprod* 1996;11:2359-70.
77. Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, le Bourhis C, North MO, Curotti G, Bellec V, Alvarez S, Dadoune JP. Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements: the limits of ICSI. *Mol Human Reprod* 1997;3:847-51.
78. Burgoyne PS, Holland K, Stephens R. Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data. *Hum Reprod* 1991;6:555-65.
79. in 't Veld PA, Halley DJJ, van Hemel JO, Niermeijer MF, Dohle G, Weber RAE. Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1997;350:490.
80. Galloway SM, Buckton KE. Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenet Cell Genet* 1978;20:78-95.
81. Vig BK. Sequence of centromere separation: orderly separation of multicentric chromosomes in mouse L cells. *Chromosoma* 1984;90:39-45.
82. Fitzgerald PH, Pickering AF, Mercer JM, Miethke PM. Premature centromere division: a mechanism of non-disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man. *Ann Hum Genet* 1975;38:417-28.
83. Zenzen MT, Wang P, Casper RF. Evidence for maternal predisposition to chromosome aneuploidy in multiple oocytes of some in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 1992;57:143-9.
84. Hook EB. Chromosome abnormalities: prevalence, risks and recurrence. In: Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith, editors. *Prenatal diagnosis and screening*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1992:351-92.
85. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 1992;29:103-8.

HOOFDSTUK V

ICSI MET CHIRURGISCH VERKREGEN ZAADCELLEN

DEEL 1

Inleiding

De introductie van de ICSI in de humane voortplantingsgeneeskunde gaf een nieuwe dimensie van therapeutische mogelijkheden in de klinische andrologie voor subfertiele mannen.

De fertiliteits-microchirurgie maakte opzuigen van epididymale zaadcellen mogelijk voor IVF. Dat werd micro-epididymale spermatozoa-aspiratie ofwel MESA genoemd (1,2,3,4). De teleurstellende zwangerschapskansen van MESA werden door middel van ICSI op slag verbeterd. Pogingen tot in-vitro rijping in co-cultuur (5) gevolgd door IVF vonden niet plaats. Het geringe aantal zaadcellen dat bij MESA verkregen wordt verklaart ook ten dele de geringe zwangerschapskans bij IVF-MESA.

De epididymis is in principe alleen als geschikte bron voor zaadcellen als er een obstructie is ten gevolge van congenitale bilaterale vas deferens agenesie (CBVDA), infectie (Chlamydia), of na mislukte chirurgie of sterilisatie. Bij een niet-obstructieve azoöspermie is testisweefsel het enige alternatief. Reeds vroeger waren minimale haardjes van spermatogenese (6, 7) gevonden bij functiestoornissen van het kiemepitheel, of secretoire azoöspermie.

Jow (8) vond in beweeglijke zaadcellen in natieve preparaten van testisbiopten, echter alleen bij een obstructieve azoöspermie. Kwantificering toonde dat minimaal 4-6 spermatiden per tubulus doorsnede nodig zijn om zaadcellen in het ejaculaat te vinden (9).

In 60% van de niet-obstructieve azoöspermiegevallen kon, ongeacht de oorzaak, testiculair nog spermatogenetische activiteit worden gevonden, die regelmatig over de testis is verdeeld (9).

Voor betrouwbaar vaststellen van azoöspermie lijkt het raadzaam tenminste twee zaadanalyses te doen en wel na eerst centrifugeren bij 1800 g gedurende 5 minuten. Veelal worden dan nog incidenteel zaadcellen gevonden, die hetzij direct voor ICSI of eventueel na cryopreservatie gebruikt kunnen worden.

De histologie van testisbipten geeft geen goede informatie over de kans tot verkrijgen van zaadcellen voor ICSI. Friedrich (10) vond dat 4 van 33 bipten histologisch géén, maar bij ICSI voldoende zaadcellen bevatten. Eveneens leverden 4 van 33 bipten geen voor ICSI bruikbare zaadcellen ondanks histologisch aangetoonde spermatogenese. De mogelijkheden om zaadcellen te verkrijgen zijn nog niet optimaal. Factoren zijn o.a. zeer geringe spermatogenese, tijd om te zoeken, het incuberen van testisweefsel en individuele ervaring van de betrokken laboratoriummedewerker.

Chirurgische methoden om zaadcellen te verkrijgen

Het microchirurgisch opzuigen van zaadcellen werd eerst gedaan als onderdeel van een reconstructieve operatie voor b.v. een rekanalisatie van het vas deferens (vaso-vasostomie) (11,12), of van vas deferens en epididymis, een vaso-epididymostomie (13). Afhankelijk van de incisieplaats in het caput epididymis werden, onder een vergroting van 10-40x, zaadcellen uit de epididymale tubulus opgezogen. Indien geen motiele zaadcellen uit distale delen van de tubulus verkregen werden, trachtte men steeds proximaler te zoeken (2), eventueel tot in de vasa efferentia (1) van de testis. Er werd verondersteld dat proximale tubuli zaadcellen leveren die weliswaar mogelijk nog niet uitgerijpt zijn, maar minder sterk verouderd/gedegeneerd zijn door epididymis-obstructie.

Lacham-Kaplan en Trounson (14) vonden aanwijzingen voor een verschil tussen muizenembryo's afkomstig van eicellen bevrucht met zaadcellen uit caput of cauda epididymis. Proximale epididymale zaadcellen zouden een ontwikkelingsstop c.q. vertraagde ontwikkeling veroorzaken van het muizenembryo in het preïmplantatie stadium. Dit effect trad minder duidelijk op als de bevruchting met ICSI plaatsvond.

De MESA techniek is nogal gecompliceerd waardoor de toepasbaarheid beperkt is, de scrotale exploratie vraagt anesthesie. De ingreep moet ingepast worden in een regulier operatieprogramma, terwijl de micro-chirurgische ingreep tijdrovend kan zijn.

De percutane epididymale spermatozoa-aspiratie, ofwel PESA (15,16) werd een oplossing. De PESA kan, indien gewenst, onder plaatselijke verdoving worden uitgevoerd. De testis wordt geïmmobiliseerd, de epididymis gelokaliseerd en met een 21 gauge butterflynaald aangeprikt. Met een 10-20 ml injectiespuit wordt een geringe hoeveelheid vloeistof uit de epididymale tubulus opgezogen. Bij terugtrekken van de naald wordt een arterieklampje op het slan-

getje tussen naald en injectiespuit gezet om de vloeistof in de naald te houden en contaminatie te vermijden. Bij een modificatie voor een exacter lokalisatie van de epididymis (17) wordt een kleine incisie gemaakt in de huid waar de epididymis aangeprikt wordt.

De testiculaire spermatozoa extractie (TESE) zou die technieken vervangen (18,19,20), mede door de eenvoud ervan. Er wordt een open biopsie gemaakt, soms met een biopsiepistool (21). De open biopsie houdt in: een kleine incisie < 1 cm in de scrotale huid dwars op de lengteas van de testis, daarna het klieven van de tunica albuginea. Een kleine hoeveelheid testisweefsel wordt geëxciëerd en vervolgens in een Petri-schaaltje opgevangen waarin zich medium met Hepes-buffer bevindt

In het IVF laboratorium wordt direct gecontroleerd of zaadcellen voorkomen in het natieve preparaat van het transportmedium, ook wel "wet prep" genoemd. (Foto 1). Na het sluiten van de incisie aan de ene kant wordt, zo nodig, de andere testis gebioteerd.

Een percutane aspiratiebiopsie van de testis was sinds 1928 (22) een mogelijkheid voor diagnose en prognose van infertiliteit. Tubuluscellen en zaadcellen werden gebruikt om de fertiliteitskans in te schatten (23,24). Die resultaten motiveerden mede de huidige TESE.

Bij obstructieve azoöspermie is deze punctie-techniek tegenwoordig ook te overwegen, maar levert minder materiaal op dan een open biopsie. Het percutaan opzuigen van zaadcellen uit de testis wordt ook wel testiculaire spermatozoa-aspiratie, TESA, of testiculaire "fine needle aspiration", TEFNA, genoemd.

Vergelijkend onderzoek (25) tussen TESE en TESA toonde aan dat bij TESE een duidelijk betere opbrengst aan zaadcellen te verwachten is.

Het prepareren van zaadcellen uit testismateriaal

ICSI met volledig onbeweeglijke zaadcellen uit het ejaculaat is bekend (26, 27) en geeft teleurstellende resultaten. ICSI met geëjaculeerde zaadcellen zal verminderde fertiliteitskansen geven bij voortdurende bewegelijkheidsstoornissen. Het is mogelijk dat bij verkrijgen van het tweede spermamonster of bij de volgende ICSI-behandeling toch bewegelijkheid gezien wordt.

Onbewegelijkheid berust vaker op rijpingsstoornissen dan op avitaliteit. Eventuele gevolgen voor het embryo, ook bij uitvoering van ICSI met spermatiden zijn nog onbekend. Isolatie van bij voorkeur bewegelijke zaadcellen uit testismateriaal bestemd voor ICSI kan op een aantal verschillende manieren plaatsvinden.

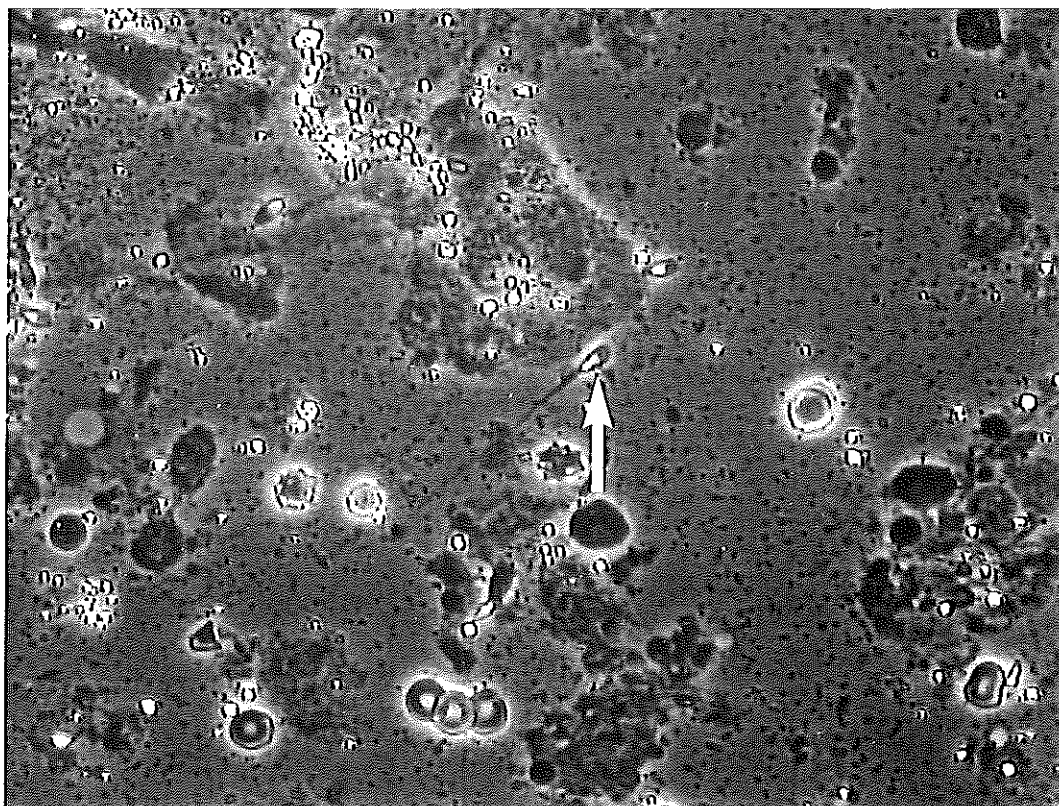


Foto 1: Natief preparaat van een testisbiopsi, zaadcel o.a. bij de pijl.

De hier beschreven zaadceleextractie is gericht op het verkrijgen van bewegende spermatozoa voor micro-injectie.

De eerste stap is het openbreken van de tubuli seminiferi uit testismateriaal om aanwezige zaadcellen te bevrijden. Het testisweefsel wordt mechanisch gespreid met plastic staafjes en een injectienaald, daarna met behulp van 2 objectglaasjes (20). Na de inspectie op de aanwezigheid van zaadcellen wordt de suspensie maximaal 4 uur geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂ tot het moment van micro-injectie. Daarna wordt de suspensie gedurende 5 min. bij 300 g gecentrifugeerd. Na resuspensie van de pellet wordt 5µL van de oplossing in de PVP druppel (10% polyvinylpyrrolidone in Hepes gebufferd Earle's medium) midden in het kweekschal-tje gebracht. Perifeer in het kweekschal-tje bevinden zich, onder een afdekkende laag paraffi-ne olie, een aantal druppels medium waarin telkens 1 eicel voor micro-injectie aanwezig is. In

de centrale druppel met PVP wordt gezocht naar een morfologisch normale bewegelijke zaadcel die na mechanisch onbewegelijk maken in de eicel gebracht wordt. Vanaf het moment van de selectie van de zaadcel uit de PVP onderscheidt de TESE zich niet van de normale standaard ICSI methode. Intraluminaal aanwezige zaadcellen kunnen ook enzymatische (28, 29) vrijgemaakt worden met o.a. collagenase om de tubuli seminiferi enzymatisch op te lossen. Die bewerking wordt vaak gecombineerd met de mechanische bewerking (29,30), hetgeen vooral bij extreme hypospermatogenese nuttig blijkt.

Fluorescentie-geactiveerde-celsortering uit de suspensie na mechanische en enzymatische bewerking (30) wordt mogelijk een alternatief om ontwikkelingsstadia van spermatozoa van elkaar te scheiden. Dat laat bij micro-injectie selectie van voorstadia van spermatozoa toe (31). Zaadcelisolatie kan door een erythrocyten-lyserende buffer vereenvoudigd worden (32).

Complicaties bij het winnen van epididymale en testiculaire zaadcellen

Bij elke nieuwe reproductieve technologie is een goede afweging van resultaten als van bijwerkingen/complicaties noodzakelijk.

a. Testiculair:

Van MESA (1) en TESE (18) zijn aanvankelijk relatief weinig postoperatieve complicaties gemeld evenals van PESA (33) en TESA (34). MESA werd meestal uitgevoerd samen met andere procedures zoals scrotale exploratie, funiculolyse, vaso-vaso of epididymo-vasostomie; de uiteindelijke complicaties zoals littekenvorming, pijn en haematoomvorming kunnen niet direct alleen aan de aspiratie van epididymale zaadcellen worden toegeschreven.

Echter na TESE werden bij echoscopische follow-up testiculaire afwijkingen op de biopsie plaats vastgesteld die zouden kunnen berusten op een ontstekingsproces/haematoom (35,36). Omdat de verzorgende arteriën onder de tunica albuginea van de testis eind-arteriën zijn, zou punctie-gerelateerde beschadiging van die vaten een verminderde perfusie van de testis of zelfs devascularisatie (35) kunnen veroorzaken. Van 64 mannen bleken er 59 echoscopisch aantoonbare afwijkingen van de testes 3-6 maanden na de biopsie te vertonen. Een eventuele herhaling van TESE is volgens Schlegel (35) pas na 6 maanden geïndiceerd om het risico te beperken dat geen zaadcellen meer worden gevonden.

De arteriële verzorging van de testis is een tweede argument om een eenmalige testisbiopsie te verrichten voor het verkrijgen van een weefselbrokje i.p.v. enkele kleine biopten. Dat kan testisschade minimaliseren, vooral bij kleine testisvolumina. De kans om zaadcellen te verkrijgen is niet kleiner, gezien de multifocale spermatogenese (9).

In een kleine groep (n=15) TESA-patiënten werden noch echoscopisch noch met FSH bepaling (34) resteffecten aan de testis gevonden. Het moment van de controle of de tijdsduur van follow-up werden niet vermeld. In een ander centrum hadden 4 van 58 TESA patiënten een haematoom evenals 10 van 34 TESE patienten (36). Bij deze TESE-mannen was na 6 maanden de littekenvorming nog echoscopisch zichtbaar.

b. Opbrengstproblemen.

Onvoldoende aanwezigheid/afwezigheid van (levensvatbare) zaadcellen in biopt is voor het paar een teleurstelling (begrijpelijk), maar blijkt vaak onvermijdelijk. Het is dus geen procedure-afhankelijke complicatie, maar eerder een biologisch variabele en tevens afhankelijk van de extractie methode. Wel is de chirurgische benaderingswijze van belang. Onvoldoende zaadcellen voor effectieve bevruchting(?) worden gemeld bij 20% van de PESA patiënten (37), bij 25%(4/15) TESA patienten (34). Niet-obstructieve azoöspermie lijkt een risicofactor. Voor de vrouw betekent een vruchteloze TESA/TESE enz. een achteraf nodeloze hyperstimulatie met de mogelijke complicaties daarbij.

TESE en aanverwante procedures met cryopreservatie van zaadcellen/weefsel kunnen de kans op niet aantreffen van zaadcellen bij de ICSI minimaliseren. Vooral bij MESA en TESE worden dan in de regel voldoende zaadcellen voor ICSI gevonden.

Daarnaast is gelijktijdig microscopisch onderzoek van een gedeelte van het biopsiemateriaal mogelijk om carcinoma in-situ als voorstadium van een seminoom uit te sluiten. Dat lijkt vooral van belang bij patiënten met cryptorchisme (38,39). De kans op de ontwikkeling van een seminoom (40) is bij cryptorchisme $\pm 2\%$ in tegenstelling tot $\pm 0,5\%$ in de normale bevolking. Gezien de grote kans op progressie van carcinoma in situ (CIS) van de testis tot seminoom (41) wordt geadviseerd bij de diagnose van CIS direct tot behandeling over te gaan (38). Echoscopie heeft bij dit onderzoek mogelijk ook een plaats.

Tabel I geeft een overzicht van de complicaties bij het chirurgisch verkrijgen van zaad.

Tabel I. Complicaties bij de man na chirurgie ter verkrijging van zaadcellen voor ICSI

<i>Complicatie</i>	<i>MESA</i>	<i>PESA</i>	<i>TESE</i>	<i>TESA</i>
Pijn	+	±	+	±
Haematoom	+	±	+	±
Infectie	+	±	+	±
Littekenvorming	+	-	+	±
Devascularisatie	-	-	+	±

Indicatiestelling voor ICSI met chirurgisch verkregen zaad

Tot nu worden bij voorkeur geëjaculeerde zaadcellen voor ICSI gebruikt, ook vanwege de resultaten (17,42,43,44,45). Vanwege veronderstelde risico's bij het gebruik van chirurgisch verkregen zaad, wordt hiervan in Nederland geen gebruik gemaakt (zie Gezondheidsraad, Planningsbesluit IVF;90).

Er zijn duidelijke indicatiegroepen voor ICSI met epididymale of testiculaire zaadcellen.

Tien procent van de mannelijke infertiliteit berust op absolute azoöspermie, grotendeels (80%) door testiculaire dysfunctie en 20% door obstructieve azoöspermie (46, 47,48).

Obstructieve azoöspermie is deels congenitaal, 1-2% betreft congenitale uni/bilaterale vas deferens agenesie (49) op basis van één of twee cystische fibrose mutaties. De overige oorzaken zijn infecties c.q. traumata (50) en nog een vager scala van primair/secundair testiculaire en neurologische oorzaken. Tenslotte is de oorzaak nog in vele gevallen onbekend (Tabel II).

Tabel II. Indeling azoöspermie

Obstructief

- Congenitaal, aplasie of obstructie (CBVDA, Müllerian duct cysts, syndr. v Young)
- Infectieus (post epididymitis bijv. Chlamydia, tuberculose)
- Tumor (prostaat)
- Postoperatief (na sterilisatie, trauma, iatrogeen na mislukte chirurgie)
- Idiopathisch (megavesicles)

Niet-obstructief

- Primair testiculair (XXY, Y-deleties, meiosestoornissen, Sertoli-cell-only, cryptorchisme)
- Secundair testiculair (chemotherapie, bestraling, toxisch)
- Neurologisch (dwarslesie, diabetische neuropathie, na lymphadenectomie, psychogeen)
- Idiopathisch
- Gonadotropine deficiëntie

Anamnese, familieanamnese, urologisch, cytogenetisch onderzoek en DNA-mutatieanalyse (CF-mutaties; deleties Y-chromosoom) zijn nodig om een oorzaak vast te stellen van partiële/totale obstructieve azoöspermie en kansen te bepalen voor het nageslacht.

Op het gebruik van voorstadia van spermatozoa voor ICSI wordt niet nader ingegaan, voor nadere informatie wordt naar de betreffende literatuur verwezen (51-65).

Literatuuroverzicht van resultaten van ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen

Een overzicht van ICSI met epididymale of testiculaire zaadcellen is zodanig gerangschikt dat er een vergelijkbare indicatiestelling is, zoals in tabellen III-VI voor respectievelijk MESA, PESA, TESE en TESA. Verder is er een recent overzicht van Cha (17).

Het eindresultaat van behandelingen hangt bij de vrouw onder meer af van factoren zoals de leeftijd en hormonale voorbereiding, het aantal beschikbare metafase II eicellen, het percentage afgebroken cycli en het aantal geplaatste embryo's.

Bij de man is onmiskenbaar de oorzaak van de azoöspermie de bepalende factor voor het eindresultaat. Het bevruchtend vermogen is hierbij maatgevend. Post-sterilisatie patiënten, vaak in een nieuwe relatie met een jongere vrouw, hebben uiteraard de betere kansen. Aan de andere

kant van het scala staan wellicht de Klinefelter-mannen (66) die incidenteel nog een minimale rest-spermatogenese hebben.

Tabel III gaat over ICSI-MESA behandelingen vanaf 1994 tot nu. Dit zijn uitsluitend patiënten met obstructieve azoöspermie. Omdat MESA technisch lastiger is, wordt steeds meer van TESE/TESA/PESA gebruik gemaakt.

Het percentage klinische zwangerschappen (pat. met foetale hartactie(HA)+) is niet altijd te achterhalen, ligt tussen 17% en 41%, de implantatie per embryo tussen 7% en 24%.

Tabel IV toont de resultaten van percutaan opzuigen van epididymale zaadcellen. Er worden vooral biochemische zwangerschappen(hCG+) beschreven, dus is vergelijking moeilijk.

Tabel V geeft een overzicht van de TESE met vers materiaal. Van belang is het percentage normale bevruchting, dat tussen 34% en 71% aangegeven wordt. De indicatiestelling is de oorzaak voor deze grote spreiding. Het percentage klinische zwangerschap is tussen 16% en 59%. Hoge percentages zijn vooral bij obstructieve gevallen te vinden. Het implantatiepercentage per embryo varieert van 14%-23%.

Tabel VI kan alleen ter illustratie gebruikt worden dat de ervaring nog te beperkt is voor evaluatie.

Tabel III. OVERZICHT MESA+ICSI

<i>Auteur</i>	<i>Jaar</i>	<i>Oorzaak Azoöspermie</i>	<i>N pat.</i>	<i>N cycli</i>	<i>N pat. spz. +</i>	<i>beweeglijke spz.</i>	<i>2PN*</i>	<i>N/ET</i>	<i>N embryo /ET</i>	<i>N hCG+ ET</i>	<i>N pat. met HA+/ET</i>	<i>Implantatie /embryo</i>	<i>Abortus</i>
Schlegel ⁶⁷	1994	Obstr. ^{1,2,3,4}	43	51	43	+	19%	34	2,3		14(41%)	24%	14%
Silber ⁴	1994	Obstr. ^{1,2}	17	17	17	+	41%	15	3,3	8(53%)	5(30%)		
Tournaye ⁶⁸	1994	Obstr. ¹	12	14	14	79%	58%	10	2,6	5(50%)	4(49%)	24%	20%
Nagy ⁴⁵	1995	Obstr. ^{1,2}		43	43	+	56%	40	2,7	23(58%)	12(30%)		
		Cryo-mesa ^{1,2}	9	9	9	+	56%	9	2,6	3(33%)	3(33%)		
Silber ⁶⁹	1995	Obstr. ¹		33	33	+	47%	31		20(65%)	12(39%)		26%
		Cryo-mesa ¹	20		20	+	56%	19		9(45%)			11%
Silber ⁷⁰	1995	Obstr. ^{1,2}	72	72	72	+	46%	65		34(53%)			21%
Hamberger ⁷¹	1995	Obstr. ^{1,2,4}	23	29	29	+	51%	27	2	9(33%)		17%	11%
Hovatta ⁴²	1995	Obstr. ^{1,2,5}	14*	14	9	+	59%	6	1,8	1(17%)	1(17%)	9%	
Mansour ²²	1996	Obstr. ^{1,2}	16	17	16	+	63%	17	3,7	6(35%)		16%	
Abuzeid ⁴³	1997	Obstr. ²	12	12	12	+	59%	12	3,1		3(25%)	8%	33%
		Cryo-mesa ²	8	9	8	+	61%	9	3,4		3(33%)	7%	66%
Aboulgar ⁴⁴	1997	Obstr. ¹	37	44	37	+	55%	44	3,7	16(36%)			19%
Cha ¹⁷	1997	Obstr. ^{1,2,5}		37			68%	36		16(44%)			27%
		Cryo-mesa ^{1,2,5}		12			72%	7		7(64%)			27%

Oorzaak azoöspermie obstructief:

1. CBVDA 2. na infectie of vasoepididymale chirurgie 3. prostaattumor 4. neurogeen 5. Andere, idiopathisch.

N Pat.: *MESA/PESA *Spz.:* spermatozoa *HA:* foetale hantactie *hCG+:* biochemische zwangerschap

2 PN: % 2 pronuclei per metafase II oöcyt.

Tabel IV. OVERZICHT PESA+ICSI

<i>Auteur</i>	<i>Jaar</i>	<i>Oorzaak</i> <i>Azoöspermie</i>	<i>N</i> <i>pat.</i>	<i>N cycli</i>	<i>N pat.</i> <i>spz. +</i>	<i>beweeglijke</i> <i>spz.</i>	<i>2PN*</i>	<i>N</i> <i>ET</i>	<i>N embryo</i> <i>/ET</i>	<i>N hCG+</i> <i>/ET</i>	<i>N pat. met</i> <i>HA+/ET</i>	<i>Implantatie</i> <i>/embryo</i>	<i>Abortus</i>
Shrivastay ¹⁶	1994	Obstr. ²	7	7	7	+	?	7§	6,8	3(43%)	3(43%)		33%
Craft ^{7,5}	1995	Obstr. ^{1,2,5}	38	42	34	+	33%	35	2,6	10(29%)	8(23%)	9%	50%
Craft ²¹	1995	Obstr. ^{1,2,5}	20	20	16	+	26%	12	2,3	3(25%)		10%	
Tsirigotis ⁷⁴	1996	Ob./n-obstr. ^{1,2,5,7}	54	59	54	+	53%	54	2,9	18(33%)		14%	
Cha ¹⁷	1997	Obstr. ^{1,2,5}		92		+	77%	92		40(43%)			27%

Oorzaak azoöspermie obstructief/niet-obstructief:

1. CBVDA 2. na infectie of vasoeepididymale chirurgie 3. prostaattumor 4. neurogeen 5. Andere, idiopathisch.

N ET: *gemengde GIFT/ZIFT *Spz.:* spermatozoa *HA:* foetale hartactie

2 PN : % 2 pronucleï per metafase II oöcyt.

Tabel V. OVERZICHT TESE+ICSI (zonder ROSI)

<i>Auteur</i>	<i>Jaar</i>	<i>Oorzaak Azoöspermie</i>	<i>N pat.</i>	<i>N cycli spz. +</i>	<i>N pat. spz.</i>	<i>beweeglijke 2PN*</i>	<i>N ET</i>	<i>N embryo /ET</i>	<i>N hCG+ /ET</i>	<i>N pat. met HA+/ET</i>	<i>Implantatie /embryo</i>	<i>Abortus</i>
Craft ⁷⁵	1993	Obstr. ⁵	1	1	1	+	46%					
Schoysman ⁷⁶	1993	Obstr/n-obstr ⁵	6	1	6	+	45% ⁴	6	1,6	2(33%)	1(16%)	20%
Silber ⁷⁷	1994	Obstr. ²	12	12			46%	9		5(42%)		
Devroey ⁷⁸	1994	Obstr. ⁵	3	3	3	+	44%	3	3,6	-	-	-
Devroey ⁷⁸	1995	N-obstr ⁵	15	13	13	+	48%	12	2,7	3(23%)	3(23%)	18%
Bourne ⁷⁹	1995	Obstr. ^{1,2,5}	6	6	6		71%	6	2,3	2(33%)		14%
Tucker ⁸⁰	1995	Obstr. ^{1,2}	7	7	7	+	38%	7	3,3		4(57%)	17%
Nagy ⁴⁵	1995	Obstr/n-obstr ²		17		+	48%	13	2,5	6(46%)	5(39%)	±38%
Tournaye ⁸¹	1995	N-obstr. ^{6,7,8,9,10,11}	38	32	32	+	57%	32	2,7	11(34%)		≥12%
Silber ⁶⁹	1995	N-obstr. ^{8,11}		32			49%	27			14(52%)	29%
Silber ⁸²	1995	Obstr. ^{1,2}		12			46%	9		6(67%)	5(56%)	23% 17%
Hovatta ⁴²	1995	Obstr/n-obstr [†]	23	21	20	+	34% ⁵	19		6(32%)	4(21%)	22% 50%
Gil-Salom ⁸³	1995	Obstr/n-obstr. ^{1,2,7,11}	21	21	21		83%	19	3		7(36%)	14% 29%
Tournaye ⁸⁴	1996	Obstr/n-obstr. ^{1,6,7,8,9,10}	124	124	114		59%	103	2,8	45(44%)		20%
Kahraman ⁸⁵	1996	N-obstr. ^{7,8,9,10}	29	29	14	±	39%	11	3,3	6(54%)		22% 17%
Tournaye ⁸⁶	1997	N-obstr. ^{6,9,10}	372		279		53%	255		81(32%)		27%
Aboulghar ⁴⁴	1997	Obstr/n-obstr	153	162	133	+	47%	133	3,6	39(29%)		10%
Abuzeid ⁴³	1997	Obstr. ^{1,5}	17	19			60%	19	4,1		6(32%)	12% 17%
Cha ¹⁷	1997			45			70%	43		18(42%)		12%
Dohle ⁸⁷	1998	Obstr. ^{1,5}		11			36%	9		4(36%)	4(36%)	

Oorzaak azoöspermie obstructief/niet-obstructief:

1. CBVDA 2. na infectie of vasopididymale chirurgie 3. prostaattumor 4. neurogeen 5. Andere, idiopathisch 6. Histologie normaal
7. Histologie hypospermatogenese 8. Incomplete "maturation arrest" 9. Maturation arrest 10. Kiemcel aplasie 11. Kiemcel aplasie, focale spermatogenese.

* SUZI/ICSI. § TESE/TESA † histologie testis biopsie vooraf 2 PN: % 2 pronuclei per metafase II oöcyt Spz.: spermatozoa HA: foetale hartactie.

Tabel VI. OVERZICHT TESA+ICSI

<i>Auteur</i>	<i>Jaar</i>	<i>Oorzaak</i> <i>Azoöspermie</i>	<i>N</i> <i>pat.</i>	<i>N cycli</i>	<i>N pat.</i> <i>spz.+</i>	<i>beweeglijke</i> <i>spz.</i>	<i>2PN^a</i>	<i>N</i> <i>/ET</i>	<i>N embryo</i> <i>/ET</i>	<i>N hCG+</i> <i>/ET</i>	<i>N pat. met</i> <i>HA+/ET</i>	<i>Implantatie</i> <i>/embryo</i>	<i>Abortus</i>
Craft ⁸⁴	1995	Obstr/n-obstr. ^{1,2,5}	15	11	11	+	?	?	?	?	?	?	?
Bourne ⁸⁸	1995	Obstr ^{2,5}	2	2	2	+	64%	2		1(50%)	1(50%)		
Friedler ²⁵	1997	N-obstr. ^{9,10,11}	37		4	+	#	#	#	#	#	#	#
Allan ⁸⁹	1997	N-obstr/obstr ^{5,9}	6	6	6	+	46%	5	2,8	3(60%)	2(40%)	-	

Oorzaak azoöspermie:

1.CBVDA 2.na infectie of vasopididymale chirurgie 3.prostaata tumor 4.neurogeen 5. Andere, idiopathisch 6.histologie normaal

7. Histologie hypospermatogenese 8. Incomplete "maturation arrest" 9.Maturation arrest 10. Kiemcel aplasie 11. Kiemcel aplasie, focale spermatogenese

Spz.: spermatozoa *HA:* foetale hartactie.

niet te berekenen.

2 PN^a : % 2 pronuclei per metafase II oöcyt.

DEEL 2

ICSI MET CHIRURGISCH VERKREGEN ZAADCELLEN: ERVARINGEN VAN HET IVF-CENTRUM DÜSSELDORF

Inleiding

De ontwikkeling van de TESE verloopt snel in Duitsland. Daarentegen heeft Nederland, door een planningsbesluit van de Gezondheidsraads Commissie Herziening Planningsbesluit IVF (90) een moratorium voor ICSI met chirurgisch verkregen zaad. Er is slechts een Nederlandse publicatie op dit gebied (87). Het moratorium berustte op onzekerheid over de geschiktheid van testiculair/epididymaal sperma en de onzekerheid over de risico's voor nakomelingen, mede na een publicatie over een aantal geslachtschromosomale afwijkingen in een kleine groep ICSI patiënten (91). Vooral de IVF-centra van de Belgische universiteiten pasten op grotere schaal ICSI met testiculaire zaadcellen toe (Tabel V, overzicht TESE).

In de literatuur werd melding gemaakt van wisselende resultaten bij extractie van zaadcellen uit testiculair materiaal, waardoor ICSI onmogelijk en de stimulatie en eicelpunctie van de vrouw overbodig werden.

De logistieke voordelen van cryo-TESE hebben er toe geleid dat in onze kliniek primair voor deze techniek gekozen werd, hoewel aanvankelijk toch geaarzeld werd om testismateriaal te gebruiken, ook na cryopreservatie. Na aanleiding van klinische resultaten van elders, werd besloten deze behandelingsmethode toe te passen. Geen lange termijn follow-up zowel van ICSI als TESE was toen bekend. De onzekerheden werden met de TESE-kandidaten nadrukkelijk besproken, evenals preconceptioneel, prenataal chromosomaal onderzoek en de beperkingen daarvan.

Een uitkomst bood een nieuwe techniek om testisweefsel na biopsie in kleine fracties in te vriezen. Slechts indien zaadcellen aanwezig zijn wordt besloten tot stimulatie van de vrouw. Bovendien zijn desnoods meerdere stimulatiecycli vanuit het testisbiopt mogelijk. De kans op complicaties van herhaalde testisbiopsieën is daarmee gereduceerd (zie desbetreffende § in dit hoofdstuk). Er wordt een eenmalige bilaterale testisbiopsie toegepast.

Uit een medisch, logistiek en financieel standpunt heeft deze methode voordelen. Ontwerper van de methode is Prof. Schulze (Anatomisch Instituut van de Universiteit Hamburg). Op een gewenst moment wordt een monster ontdooid, mechanisch en enzymatisch (28) zaadcellen geïsoleerd. Reeds eerder waren de mogelijkheden daartoe aangegeven (34,92,93). De door Schulze ontwikkelde methode gebruikt kleine testisbiopsie fragmenten als uitgangsmateriaal voor invriezen, terwijl Oates (93) en Romero (94) gehomogeniseerd weefsel invriezen. Het invriezen bleek geen nadelige invloed op de ICSI resultaten te hebben. Na een eerste zwangerschap met Schulze's methode (95) in 1997 is dit de eerste publicatie over cryo-TESE in een grotere patiëntengroep.

Vooronderzoek van de patiëntenpopulatie en stimulatieprotocollen

De patiëntenpopulatie bestond uit 2 groepen:

- a. Regionale patiëntengroep (n= 125).
- b. Transport groep (n= 40), 35 met testisbiopsie, 5 met epididymaal cryo-sperma en eicel-transport vanuit Nederland.

Alle paren werden standaard onderzocht op HIV en HbsAg. Op indicatie werd eveneens CF-diagnostiek uitgevoerd.

De paren afkomstig uit Duitsland werden gekaryotypeerd (Tabel XIII), Nederlandse patiënten werden hiertoe niet verplicht.

Bij de uit Duitsland afkomstige mannen werd een serum-FSH-bepaling gedaan.

De meeste Duitse patiënten hadden een lang protocol, bestaande uit voorbehandeling met een anticonceptiepil in de vóór-cyclus, vanaf dag 23 gestart hypofysaire „down-regulatie” d.m.v. een subcutaan of intranasaal GnRH-analoog. Gestart werd met hMG of FSH (100-150 IU rec-FSH s.c. of hMG 150 IU i.m.) bij de daaropvolgende menstruatie na echoscopische controle op ovariële cysten van het endometrium.

Ovulatieinductie vond plaats met 5000 IU hCG tot 10.000 IU hCG s.c./i.m., in een aantal gevallen rec-hCG.

Bij de minimale aanwezigheid van 1 dominante follikel van (18 mm. en 2 follikels van (15 mm. werd hCG 35 uur vóór de punctie i.m. of s.c. toegediend.

Nederlandse patiënten volgden het stimulatieprotocol van het verwijzende IVF-centrum.

Het aantal terug te plaatsen embryo's werd geïndividualiseerd, afhankelijk van de leeftijd van

de vrouw, ovariële reactie, aantal voorafgaande pogingen en de wens van de patiënt. Geadviseerd werd 2 embryo's te plaatsen, meer dan 3 embryo's werden nooit geplaatst.

De luteale fase werd met vaginaal progesteron 3x200 mg per dag, hCG tot 4x 1500 IU, of een combinatie van deze 2 methoden ondersteund.

Serum-hCG en progesteron werd minimaal 15 dagen na de embryoplantsing uitgevoerd. Een klinische zwangerschap werd door een echoscopisch onderzoek 2 weken later bevestigd.

Gemodificeerde werkwijze TESE, IVF-Centrum Düsseldorf

Het transport uit de O.K. naar het IVF-lab vond in IVF-kweekmedium met 20 mM Hepes-buffer plaats. Bij transport over langere afstanden werd de temperatuur op 37°C gehouden in hermetisch afgesloten buisjes zoals soms bij eiceltransport, direct op de buikhuid geplakt.

Voor histologisch onderzoek werd een weefselstukje in glutaraldehyde/OsO₄ gefixeerd, inge-

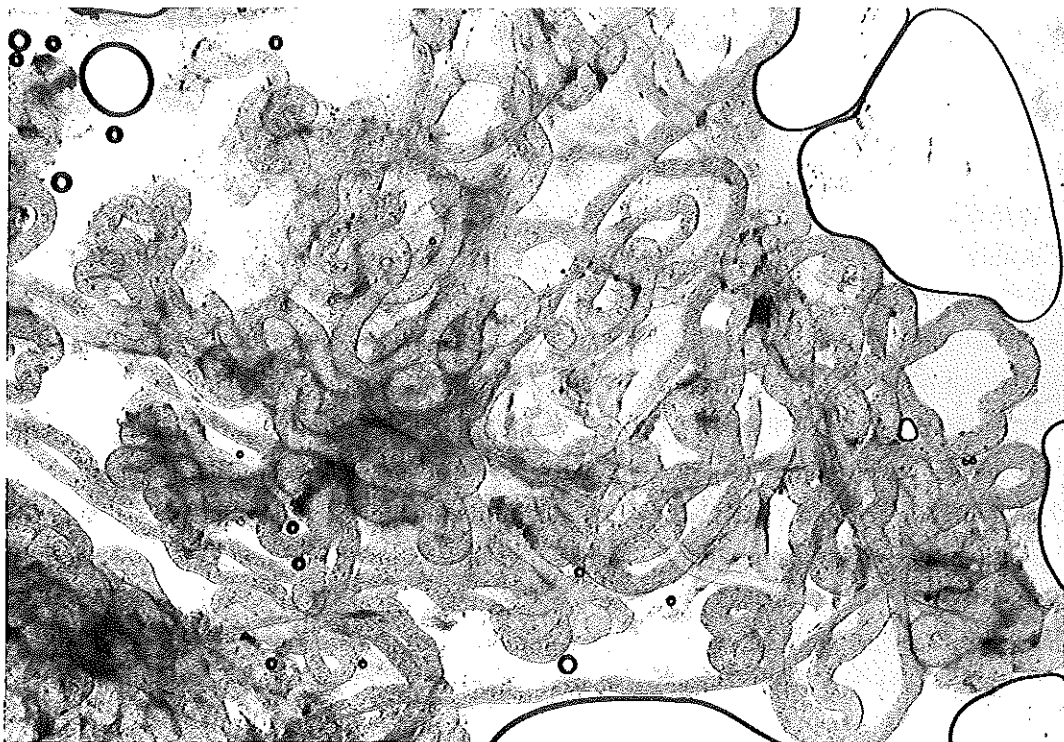


Foto 2. TESE materiaal, tubuli seminiferi, vóór enzymatische bewerking.



Foto 3. TESE materiaal, tubuli seminiferi, vóór enzymatische bewerking (omkeermicroscop).

bed in Epon 812 en voorbereid voor semi-dunne coupes volgens de techniek van Holstein en Wulfhekel (96). De histologische beoordeling (28) van de testisbiopten gebeurde aan de hand van de diameter van de tubuli seminiferi, de hoogte van het kiemepitheel, de dikte van de lamina propria, de aanwezigheid van type A pale of type A dark spermatogonia, spermatocyten en verdere ontwikkelingsstadia van spermatiden. Het histologisch onderzoeken van een testisbiopt was bestemd voor research aan de universiteit in Hamburg. Primair wordt dit onderzoek gedaan om, vóór verdere behandeling plaatsvindt, een prognose over de kans van slagen bij het vinden van zaadcellen te geven.

Het preparaat wordt, na controle van het transportmedium op de aanwezigheid en vitaliteit van zaadcellen, geprepareerd voor de invriesprocedure (Foto 2 en 3). Indien geen zaadcellen, ook niet na centrifugeren op 1800 g, worden aangetroffen wordt een extractie procedure uitgevoerd. Als geen zaadcellen kunnen worden aangetoond wordt afgezien van stimulatie bij de vrouw.

Het materiaal wordt in kleine porties ter grootte van een speldenknop in 0,7 ml Sperm-Freeze medium™ (Medicult, Hamburg, FRG, cat.# 3080) in 1 ml kweekmedium over zoveel mogelijk buisjes (Nalge Nunc Int., Naperville, USA, cat.# 368632) verdeeld. Hierdoor kan volstaan worden met een éénmalige testisbiopsie.

Het vriesprogramma verloopt gedurende 30 min volautomatisch gecomputeriseerd met een Planer® Biomed MR2. Na 30 min. incubatie in het invriesmengsel volgt een fase van langzame koeling en wordt na 10 min snel gekoeld tot „140°C. De eindtemperatuur zakt daarna tot een waarde tussen de „160°C en „170°C. De afgesloten buisjes worden verder in vloeibare stikstof bewaard.

De isolering van zaadcellen uit een ingevroren biopt

In een bad van 37°C wordt een buisje ontdooid en de inhoud overgezet in 1 ml voor-gewarmd (37°C) medium, 1x gewassen en met behulp van insuline-injectienaalden mechanisch gemacereerd gedurende 5 min. Hierna wordt de enzymatische bewerking gestart en blijft de biopsie minimaal gedurende 2 uur in deze oplossing in de broedstoof.

Voor de enzymatische bewerking wordt gebruik gemaakt van een 100x voorraad oplossing van 40 mg/ml collagenase type 1A (Sigma, cat.# C-2674, Heidelberg, FRG), vervaardigd met Sperm Prep medium, na steriel filtreren bewaard in aliquots op -20°C. De voorraadoplossing trypsine remmer Type III (Sigma, Heidelberg, FRG, cat.# T-2011) met 10 mg/ ml H₂O werd eveneens steriel gefiltreerd en bij -20°C ingevroren.

Aan het biopt wordt 10µl collagenase 1µl trypsin-inhibitor toegevoegd en geïncubeerd gedurende 2 uur bij 37°C. De enzymatische bewerking werd na verloop van tijd vereenvoudigd door uitsluitend met collagenase Type IV-S (Sigma, cat.# C-9572, Heidelberg, FRG) te werken.

Na de vertering van de tubuli worden de restanten uit het medium verwijderd en het supernatant 10 min. op kamertemperatuur bij 1800 g gecentrifugeerd. De pellet wordt in 1 ml medium gesuspenseerd en tot kort voor de ICSI-procedure in de broedstoof bewaard, minimaal 2 uur. Het bleek zinvol deze tijd te verlengen omdat er dan gemakkelijker beweeglijke zaadcellen worden gevonden. Aan het eind van de dag vóór de eicelpunctie wordt deze procedure gestart. Een klein risico bestaat dat onnodig ontdooid is als geen eicellen bij de punctie aangetroffen worden, hetgeen uitzonderlijk is.

Na nogmaals centrifugeren wordt het sediment gebruikt voor ICSI, na controle op aanwezigheid van zaadcellen in de pellet bij een vergroting van 400x.

In een petrischaal wordt centraal een druppel PVP aangebracht en perifeer een aantal druppels kweekmedium bestemd voor de eicel tijdens de ICSI. Aan de andere zijde tegenover het PVP wordt halvemaanvormig een mediumloper van ongeveer 200 μ L gelegd waarin 10 μ L van de pellet met de testiculaire zaadcellen wordt gepipetteerd. Uit deze mediumloper worden stuk voor stuk zaadcellen geselecteerd en in de centrale PVP druppel gedeponeerd. De verdere procedure verloopt zoals bekend van de normale standaard ICSI techniek.

ICSI met TESE uit gecryopreserveerd testisweefsel of gecryopreserveerde epididymale zaadcellen:

Resultaten en klinische aspecten.

A. IVF-ICSI met gecryopreserveerd testisweefsel na enzymatische zaadceleextractie: Regionale patiëntenpopulatie.

Bij 26 paren met obstructieve azoöspermie werden 45 TESE cycli en bij 99 paren met niet-obstructieve azoöspermie 186 TESE cycli uitgevoerd. In deze laatste groep betrof het in ongeveer de helft een “idiopathische” en in 20 % cryptorchisme als oorzakelijke factor. De leeftijd van vrouwen en mannen in beide groepen waren vergelijkbaar. In de groep met obstructieve azoöspermie waren de vrouwen gemiddeld 31,8 jaar ($SD \pm 4,4$, range 26-41 jaar), de mannen 39,6 jaar ($SD \pm 7,2$, range 26-55 jaar). In de groep met niet-obstructieve azoöspermie was de gemiddelde leeftijd van de vrouwen 32 jaar ($SD \pm 4,1$, range 19-43 jaar), van de mannen 35,9 jaar ($SD \pm 6,7$, range 36-56 jaar). De gemiddelde duur van de kinderwens in beide groepen was respectievelijk 3,8 en 5,6 jaar.

In tabel VII wordt de diagnose vermeld van de obstructieve of niet-obstructieve azoöspermie. In tabel VIII zijn de chromosomale afwijkingen aangegeven, onderverdeeld naar geslacht en indicatie.

Tabel VII. Cryo-TESE: Overzicht samenstelling regionale patiëntenpopulatie

<i>Indicatie</i>	<i>Obstructief</i>	<i>Niet-obstructief</i>
Post chirurgisch/Infectieus	15	3
Na sterilisatie/refertilisatie	11	
Cryptorchisme unilateraal		5
Cryptorchisme bilateraal		17
Idiopatisch		47
Bof orchitis		4
Testisatrofie		5
Post traumatisch		4
Diabetes		1
Testistumor		10
Infectieus		3
Totaal patiënten	26	99

Tabel VIII. Chromosomale afwijkingen bij TESE-paren uit de regionale populatie met obstructieve en niet-obstructieve azoöspermie

Afwijkingen niet-obstructieve azoöspermiegroep (n=99)

Man	46,XY,inv(2)(q21q22)	Vrouw	45,X/46,XX(10%,90%)
	47,XXY		45,X/47,XXX/46,XX(4/2/94)
	46,XY,rob(13;14)		45,X/47,XXX/48,XXXX/46,XX (2%,2%,2%,94%)
	46,XY,t(4;19)(q34,q13.3)		46,XX,t(2;19)
Totaal	4,04%		4,04%
	geen afwijkingen bij man én vrouw		

Afwijkingen obstructieve azoöspermie groep(n=26)

Man	0	Vrouw	46,XX,dup(9)(q21.1q21.2)
CF†	2		0

† CF = cystische fibrose mutatie heterozygoot

B. IVF-ICSI bij transport TESE en MESA.

Tussen april 1995 en maart 1998 werden in het samenwerkingsverband tussen de IVF afdeling van het Rijnstate ziekenhuis en het IVF centrum Dfsseldorf een patiëntengroep van 40 paren behandeld met ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen.

De testisbiopten werden in Arnhem onder lokale anesthesie verkregen. Het transport duurde 2-3.5 uur.

De onderverdeling van de transportgroep in obstructieve (n= 23) en niet-obstructieve (n=17) azoöspermie is in tabel IX weergegeven, zo mogelijk met oorzaak. Bij obstructieve azoöspermie bestond chirurgie uit reanastomose. Chirurgische ingrepen in de niet-obstructieve groep betroffen o.a.torsio testis.

In totaal werden 79 behandelingen gestart.

De gemiddelde leeftijd van de vrouwen in deze groep was 33,4 jaar (SD±4,9 jaar, range 18-42) en van de mannen 39,5 jaar (SD± 8jaar, range 27-56).

Bij de obstructieve gevallen (49 cycli) werd in 40 gevallen ICSI gedaan met testiculaire en in 9 cycli met gecryopreserveerde epididymale zaadcellen.

In de 30 cycli van paren met niet-obstructieve azoöspermie werd uitsluitend gebruik gemaakt van testiculaire zaadcellen.

Tabel IX. Transport ICSI-cryo-TESE: Oorzaken van obstructieve en niet-obstructieve azoöspermie

<i>Obstructieve Azoöspermie</i>	<i>N patiënten</i>	<i>Niet-obstructieve azoöspermie</i>	<i>N patiënten</i>
CBVDA	6		
Na chirurgie of infectie	14	Na chirurgie of infectie	3
Na chirurgie of infectie+toxisch	1	Toxisch	1
Idiopathisch	2	Idiopathisch	12
		Tumor	1
Totaal	23		17

Resultaten

• Regionale groep

De resultaten uit de laboratoriumfase en klinische fase zijn in tabel X en XI samengevoegd. Een onderverdeling van de resultaten van de cryo-TESE in de regionale groep naar cyclusnummer, het aantal geplaatste embryo's, indicatiestelling, serum-FSH waarden bij de man, motiliteit van de geïnjecteerde zaadcel en histologie van het testisweefsel worden in tabel XII tot XVII gepresenteerd.

Het gemiddeld aantal metafase II eicellen in de groep met obstructieve azoöspermie bedroeg 6,6 (SD±4,4, range 1-31) in de niet obstructieve groep eveneens 6,6 (SD±3,8, range 1-18).

In 38(84%) van de 45 cycli uit de groep (obstructief) werden gemiddeld 2,2 embryo's geplaatst, in 152(82%) van 186 cycli uit de tweede groep(niet-obstructief) gemiddeld 2,1.

Het bevruchtingspercentage in deze groepen was niet verschillend.

Er kon een statistisch significant verschil($p=0,02$) in implantatie worden aangetoond tussen obstructieve (19%) en niet obstructieve(10%) oorzaken. Onderverdeling naar indicatie van niet-obstructieve azoöspermie toonde een verschil in bevruchtingspercentage, niet in implantatie (Tabel IV).

Er werd een significant verschil vastgesteld, zowel voor de bevruchtungskans van metafase II-eicellen ($p=0,001$) als voor de implantatiekans ($p=0,04$), bij gebruikmaking van bewegelijke versus onbewegelijke testiculaire of epididymale zaadcellen(Tabel XV).

De serum-FSH waarden(Tabel XVI) van de mannen uit de groep met obstructieve azoöspermie was gemiddeld 3,9 IU/L(SD±2,4, range 2-9), in de niet-obstructieve groep naar indicatie idiopatisch 8,6 IU/L (SD±7,1, range 2-26), na een behandeling voor een testistumor 9,2 IU/L (SD±6,4, range 3-23) bij één of dubbelzijdige maldescensus testis 15,9 IU/L (SD±13,1, range 1-40).

Van de 44 klinisch zwangeren hadden 18% een meerling (6x tweeling, 2x drieling) zwangerschap. In 12 (27%) was er een abortus in het eerste trimester: een tweelingzwangerschap die in zijn geheel aborteerde en 2 embryo's van een drielingzwangerschap.

Er werden 33 kinderen geboren, 5 zwangerschappen zijn voortgaand.

Eén zwangerschap werd beëindigd wegens een chromosoomafwijking (47XY+mar/46,XY).

Een hartafwijking bij het kind bleek postnataal op tubereuze sclerose te berusten.

Prenataal cytogenetisch onderzoek werd gedaan bij 11 foetus (34%), er werd een marker-chromosoom gevonden. De overige zwangeren zagen af van pre- of postnataal chromosomaal onderzoek.

Tabel X. Cryo-TESE: Regionale patiëntenpopulatie, laboratoriumgegevens van ICSI

<i>Lab fase</i>	<i>N cycli</i>	<i>N ET</i>	<i>% ET</i>	<i>N M II* oöcyten</i>	<i>N 2PN</i>	<i>% normale bevruchting</i>
<i>Obstructief</i>						
Testiculair	45	38	84	295	106	35,9§
<i>Niet-obstructief</i>						
Testiculair	186	152	82	1234	388	31,4§

MII = Metafase II oöcyten § $p = 0,13$ Niet significant

Tabel XI. Cryo-TESE: Regionale patiëntenpopulatie, klinische gegevens

<i>Patiënt fase</i>	<i>gem aantal MII* ooc</i>	<i>totaal embryo's</i>	<i>n embryo's /ET</i>	<i>N klin. zwanger</i>	<i>Implantatie /embryo</i>	<i>zwanger /cyclus</i>	<i>zwanger /ET*</i>
<i>Obstructief</i>							
Testiculair	6,5	84	2,2	16	19%†	35,6%	42,1%
<i>Niet-obstructief</i>							
Testiculair	6,6	323	2,1	28	10,2†%	15,1%	18,4%

MII = Metafase II oöcyten † $p = 0,02$ ((2))

Tabel XII. Cryo-TESE: Behandelingscycli regionale patiëntenpopulatie onderverdeeld naar cyclusnummer

<i>Cyclus nummer</i>	<i>Totaal</i>		<i>Obstructief</i>			<i>Niet-obstructief</i>		
	<i>N</i> <i>patiënten</i>	<i>ET</i>	<i>N</i> <i>patiënten</i>	<i>ET</i>	<i>% ET</i>	<i>N</i> <i>patiënten</i>	<i>ET</i>	<i>% ET</i>
1	125	102	26	22	85	99	80	81
2	66	54	11	10	91	57	48	84
3	30	24	4	2	50	22	18	82
4	8	8	2	2	100	5	5	100
5	4	3	1	1	100	3	1	33
6	2	1	1	1	100			
Totaal	231 cycli	192	45 cycli	38	84	186 cycli	152	82

Tabel XIII. Cryo-TESE: Regionale patiëntenpopulatie, Invloed van het aantal geplaatste embryo's

<i>Aantal embryo's /ET</i>	<i>N</i> <i>cycli</i>	<i>N</i> <i>zwanger</i>	<i>zwanger /ET</i>
<i>Obstructieve azoöspermie</i>			
1	6	1	16,7%
2	18	5	27,8%
3	14	10	71,4%
<i>Niet-obstructieve azoöspermie</i>			
1	37	3	8,1%
2	59	11	18,6%
3	56	14	25%

Tabel XIV. Cryo-TESE: Regionale patiëntenpopulatie, invloed van indicatiestelling van TESE op de implantatie per embryo

<i>Indicatie TESE</i>	<i>Cycli</i>	<i>N</i> <i>ET</i>	<i>NM II*</i> <i>oöcyt</i>	<i>N</i> <i>2PN</i>	<i>n embryo</i> <i>Totaal</i>	<i>n embryo</i> <i>/ET</i>	<i>N klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>zwanger</i> <i>/Cyclus</i>	<i>zwanger</i> <i>/ET</i>	<i>implantatie</i> <i>Embryo</i>
Cryptorchisme	41	34	281	87§	79	2,3	5	12,2%	14,7%	6,3%†
Idiopatisch	86	72	559	181§	144	2	14	16,3%	19,4%	12,5%†
testistumor	20	18	142	63§	40	2,2	3	15%	16,7%	10%†

MII = Metafase II oöcyten † $p=0,3$ § $p=0,01$ (χ^2)

Tabel XV. Cryo-TESE/ MESA: Regionale patiëntenpopulatie, invloed van beweeglijkheid van de zaadcel in de lab- en klinische fase

<i>bewegelijk</i>	<i>cycli</i>	<i>n MII*</i> <i>oöcyt</i>	<i>n</i> <i>2PN</i>	<i>normale</i> <i>bevruchting</i>	<i>N ET</i>	<i>% ET</i>	<i>N klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>zwanger</i> <i>/cyclus</i>	<i>zwanger</i> <i>/ET</i>	<i>N</i> <i>embryo</i>	<i>implantatie</i> <i>/embryo</i>
Pos	101	655	285	43,5%§	90	89	28	27,7%	31,1%	207	16,4%†
Neg	80	544	122	22,4%§	60	75	7	8,7%	11,6%	117	8,5%†*

MII = Metafase II oöcyten † $p=0,04$ (χ^2) § $p=0,001$ (χ^2)

Tabel XVI. Cryo-TESE: Regionale patiëntenpopulatie, invloed van de serum-FSH spiegel op de implantatie

<i>Serum-FSH</i> <i>IU/L</i>	<i>N</i> <i>cycli</i>	<i>N</i> <i>ET</i>	<i>Totaal</i> <i>n Embryo's</i>	<i>klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>zwanger</i> <i>/cyclus</i>	<i>zwanger</i> <i>/ET</i>	<i>implantatie</i> <i>/Embryo</i>
<i>Obstructief</i>							
<6	28	25	52	6	21,4%	24%	11,5%
>5 <10	7	6	14	5	71,4%	83,3%	57,1%
<i>Niet-obstructief</i>							
<6	51	41	88	8	15,7%	19,5%	10,2%
>5 <10	32	25	50	3	9,4%	12,0%	6%
>9 < 20	51	37	81	10	19,6%	27,0%	17,3%
>19	29	27	57	2	6,9%	7,4%	3,5%

Tabel XVII. Cryo-TESE: Histologie bij niet-obstructieve azoöspermie, invloed op implantatie per embryo

<i>Histologie N=61 patiënten</i>	<i>N</i> <i>patiënten</i>	<i>N</i> <i>cycli</i>	<i>N</i> <i>ET</i>	<i>%</i> <i>ET</i>	<i>Totaal n</i> <i>embryo's</i>	<i>klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>implantatie</i> <i>/embryo</i>
Hypospermatogenese	31	55	43	78	77	8	11,7%†
Sertoli cell only	11	16	9	56	18	0	0
Hypospermatogenese met							
rijpe spermatiden	13	24	21	87	52	3	7,7%†
mixed atrofie	5	9	9	100	20	0	0
fokale tubulusatrofie	1	2	2	100	4	1	

† $p=0.4$ n.s.

• Transportgroep

De resultaten uit de laboratoriumfase en patiëntenfase zijn in tabel XVIII en XIX, met bewegelijke of onbewegelijke zaadcellen worden in tabel XX getoond. ICSI kon in 56 cycli met bewegelijke en in 23 met niet-bewegelijke zaadcellen worden uitgevoerd.

Het gemiddelde aantal metafase II eicellen per eicelpunctie in de groep met obstructie (TESE) bedroeg 7 (range, 2-27), bij MESA 7,1 (range, 2-14) en bij paren zonder obstructie 8,3 (range, 1-21).

In 44 (90%) van de 49 cycli uit de groep (obstructief) werden gemiddeld 2,3 embryo's geplaatst, in 24 (80%) van 30 cycli uit de tweede groep(niet-obstructief) gemiddeld 1,9.

Het bevruchtingspercentage was significant verschillend ($p=0,001$) tussen de twee groepen: 17% voor de niet-obstructieve en 42-44% voor de obstructieve groep (Tabel XIX). Het aantal klinische zwangerschappen in deze groep van transport TESE/MESA patiënten was 30-56% per cyclus en 38-56% per ET. De implantatiepercentages per embryo liggen voor beide groepen tussen de 18,3-36,4% per embryo (n.s.).

Bij gebruikmaking van bewegelijke/ onbewegelijke testiculaire of epididymale zaadcellen was de bevruchtungskans van metafase II-eicellen significant verschillend ($p=0,001$), de implantatiekans ($p=0,06$) bereikte geen significantie.

Er waren 28 klinische zwangerschappen ($n=28$) in deze groepen, waarvan 8 (29%) tweelingen. Er trad bij 6 een abortus op (21%), zie tabel XXI. De overige zwangerschappen eindigden in een partus ($n=13$), de resterende ($n=8$) zijn doorgaand, één patiënt ging voor de follow-up verloren.

Van de partus waren 2 immatuur, in één geval een tweeling met voortijdige weeënactiviteit, in het andere geval voortijdig gebroken vliezen. Eén partus vond in de 34ste zwangerschapsweek plaats zonder verdere complicaties.

Bij 40% van de kinderen werd een prenatale karyotypering gedaan, waarbij geen afwijkingen werden vastgesteld. Postnataal waren er in de gehele groep geen aangeboren afwijkingen.

Tabel XVIII. Transport Cryo-TESE: Laboratoriumgegevens van ICSI

<i>Lab-fase</i>	<i>N cycli</i>	<i>N ET</i>	<i>% ET</i>	<i>N M II*</i> <i>oöcyten</i>	<i>N bevruchte</i> <i>oöcyten</i>	<i>% be-</i> <i>vruchting</i>	<i>N 2PN</i>	<i>% normale</i> <i>bevruchting</i>
<i>Obstructief</i>	49	44	90	346	170	49	146	42
Testiculair	40	35	88	282	142	50	118	42†
Epididymaal	9	9	100	64	28	44	28	44†
<i>Niet-obstructief</i>								
Testiculair	30	24	80	232	69	30	56	24†

* *MII = Metafase II oöcyten † obstructief versus niet-obstructief* $p=0,001$ (X^2)

Tabel XIX. Transport Cryo-TESE: Klinische gegevens

<i>Patiënt-fase</i>	<i>gem.aantal</i> <i>ooc</i>	<i>totaal</i> <i>embryo's</i>	<i>n embryo's</i> <i>IET</i>	<i>N klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>implantatie</i> <i>/embryo</i>	<i>zwanger</i> <i>/cyclus</i>	<i>zwanger</i> <i>/ET</i>
<i>Obstructief</i>		104	2,3	19	22,1%	38,7%	43,1%
Testiculair	7,0	82	2,3	14	18,3%†	35,0%	40,0%
Epididymaal	7,1	22	2,4	5	36,4%†	55,6%	55,6%
<i>Niet-obstructief</i>							
Testiculair	8,2	46	1,9	9	26,1%†	30,0%	37,5%

† $p=0,1$ n.s

Tabel XX. Transport Cryo-TESE/ MESA: Invloed van zaadcelmotiliteit in de lab- en patiënten-fase

<i>Motiliteit</i>	<i>cycli</i>	<i>n MII*</i> <i>oöcyt</i>	<i>n</i> <i>2PN</i>	<i>normale</i> <i>bevruchting</i>	<i>N ET</i>	<i>% ET</i>	<i>N klin.</i> <i>zwanger</i>	<i>zwanger</i> <i>/cyclus</i>	<i>zwanger</i> <i>/ET</i>	<i>N</i> <i>embryo</i>	<i>implantatie</i> <i>/embryo</i>
Positief	56	377	150	39,8%§	52	92,9	22	39,3%	42,3%	112	25,9%†
Negatief	23	195	49	25,1%§	16	69,6	4	17,4%	25%	36	11,1%†

MII = Metafase II oöcyten † $p=0,06$ n.s. § $p=0,001$ (X^2)

Discussie

In het algemeen kan over de selectie van mannen voor TESE gesteld worden dat histologisch onderzoek van een testisbiopt slechts van beperkte prognostische waarde is voor de fertiliteitsbehandeling. Histologie, uit eigen ervaring en de literatuur (9,10,97), geeft geen betrouwbare prognose op het vóórkomen van zaadcellen. De kans op het aantreffen van carcinoma in situ (CIS) in een biopt wordt door het instituut in Hamburg op 1-1,5 % geschat (persoonlijke mededeling). De frequentie hangt af van de oorzaak van de infertiliteit, bijvoorbeeld cryptorchisme (40,41).

De uitkomst van de serum-FSH-waarde van de man (Tabel XVI) is nooit aanleiding geweest a priori paren van behandeling uit te sluiten. Serum-FSH waarden hebben geen klinische consequenties voor TESE. Er is geen correlatie van FSH met het testisvolume en biopsieresultaten (25,85). Indien zaadcelextractie volgens de door ons gebruikte methode wordt uitgevoerd, is er wel een negatieve correlatie tussen serum-FSH en zaadcellen in het biopt (98). Serum-FSH speelt geen rol (Tabel XVI) bij de implantatiekans van cryo-TESE embryo's (99). Gilbaugh toonde bij mannen met een serum-FSH van > 30 IU/L aan dat in 48% van de biopsieën zaadcellen voorkomen (101). Het kiemepitheel is bij een verhoogd FSH niet altijd volledig gedestruëerd. FSH verhoging weerspiegelt het compensatiemechanisme bij een gedeeltelijke destructie (101).

Of cryo-TESE een alternatief is voor TESE met vers biopsiemateriaal moet op een aantal punten getoetst worden:

- Zijn bij alle cryo-TESE voldoende zaadcellen voor ICSI gevonden?
- Zijn implantatiepercentages bij cryo-TESE hetzelfde als met TESE in de literatuur?
- Is er invloed van bewegelijkheid van de zaadcellen die voor micro-injectie werden geselecteerd op bevruchting en implantatie?
- Zijn de resultaten van cryo-TESE na transport van testisweefsel gelijkwaardig aan cryo-TESE zonder transport?
- Wat zijn de risico's voor de nakomelingen na toepassing van deze technieken?

Bij alle cryo-TESE behandelingen werd voldoende zaadcelmateriaal verkregen om ICSI uit te voeren.

Vergelijking van de implantatiekansen bij cryo-TESE (10-19%, Tabel XI) met TESE met vers materiaal (12-23%, Tabel V) laat geen grote verschillen in uitkomst zien. De groepen obstructief/niet-obstructief worden soms niet apart gepresenteerd en hebben een grote verscheidenheid aan indicaties. Het implantatiepercentage per embryo is niet altijd te achterhalen. Tournaye et al.(86) hadden bij 372 patiënten een goed zwangerschapscijfer. De implantatiepercentages in de ondergroepen kiemcelaplasie (9%), differentiatiestoornis (7%), of in een andere publicatie (102) aplasie (n=140 cycli) 6,7%, voor uitrijpingsstop (n=72 cycli) 15,9% en hypoplasie (n=29 cycli) 5,3% tonen de invloed van de oorzakelijke factor. In tabel XVII is dit fenomeen ook enigszins zichtbaar.

De Croo et al.(103) vergelijken TESE met vers materiaal en cryomateriaal, het cryo-materiaal bestaat hier uit ingevroren geëxtraheerde zaadcellen. Verder verschillen tussen de twee groepen maken een beoordeling onmogelijk. Of de klinische resultaten met of zonder cryopreservatie van weefsel verschillen kan pas beantwoord worden na een gerandomiseerde studie van beide methoden. Dit onderzoek heeft nog nergens plaatsgevonden.

De invloed van motiliteit op bevruchting en implantatie wordt bepaald door: de bron van de gebruikte zaadcellen(ejaculaat, epididymis of testis) en of bij initiële onbewegelijkheid na afwachten toch minimale motiliteit optreedt en vitaliteit van de zaadcel.

De beweeglijkheid van geïnjecteerde zaadcellen (Tabel XV en XX) heeft grote betekenis voor het resultaat door significant lagere bevruchtungskans van onbewegelijke spermatozoa na ICSI bij cryo-TESE. De implantatiekansen van embryo's na cryo-TESE met onbewegelijke zaadcellen is tenminste in de regionale groep significant lager (Tabel XV).

Nijs et al.(104) konden een groot verschil tussen implantatie van embryo's na ICSI met totaal onbewegelijke en initieel onbewegelijke zaadcellen aantonen. Het implantatiepercentage was, naberekend uit deze studie, van embryo's van totaal immotiele testiculaire zaadcellen 10,2% (26 cycli). Dit komt overeen met ons materiaal (Transport-cryo-TESE 11,1%, cryo-TESE 8,5%). Een exacte vergelijking is niet mogelijk omdat de implantatie bij Nijs et al. op de biochemische zwangerschap gebaseerd is en bij ons per hartactie. Nagy et al.(105), vinden een implantatie van 11,1 % per embryo (14 cycli). Vandervorst et al.(106) en Nijs (104) treffen bij onbewegelijke zaadcellen uit het ejaculaat lagere bevruchtingspercentages aan. De slechtere bevruchting bij de geëjaculeerde onbewegelijke zaadcellen werd verklaard door de aanwezigheid van verouderde gedegenerende zaadcellen (104).

De invloed van transport op de bevruchting van de eicel of op de implantatiekans van geplaatste embryo's na cryo-TESE wordt getoetst aan de gegevens van de laboratorium- en klinische fase van de groepen met transport (Tabel XVIII en XIX) en zonder (Tabel X en XI). Theoretisch kan de bevruchting en implantatie bij obstructieve azoöspermie als "gouden standaard" genomen worden aangezien de productie en het potentieel van de zaadcel bij deze oorzaak van infertiliteit niet afwijkend behoeft te zijn.

Bij de transportgroep met obstructieve azoöspermie was het percentage normale bevruchting 42%, zonder transport 35,9%, de implantatie per embryo 18,3% versus 19% zonder transport (Cochran-Mantel-Haenszel $RR=0,877$ n.s.).

In geval van niet-obstructieve azoöspermie bedroeg het percentage normale bevruchting 24%, zonder transport 31,4% ($p=0,02$), het implantatiepercentage per embryo 26,1% versus 10,2% ($p=0,002$). De verschillen bij de niet-obstructieve groep zouden verklaard kunnen worden door een andere samenstelling van de groepen. Zoals uit tabel XIV blijkt heeft cryptorchisme een weliswaar normaal bevruchtigingspercentage (31%), maar een matige implantatiekans per embryo (6,3%).

Bij mannen met obstructie worden geen verschillen gevonden wat betreft bevruchtigingscapaciteit van de zaadcel en de implantatiekans van de uit ICSI ontstane embryo's.

De conclusie luidt dat transport geen nadelig effect heeft.

Follow-up gegevens van ICSI nakomelingen geven een significante verhoging van het aantal geslachtschromosomale afwijkingen aan. Deze bevinding is waarschijnlijk eerder gerelateerd aan de gebruikte gameten dan aan de ICSI-techniek zelf (107). Voor zover bekend zijn tot nu toe de geslachtschromosomale afwijkingen bij ICSI-kinderen afkomstig van de vader (ongepubliceerde gegevens, persoonlijke mededeling Bonduelle). De gemiddelde leeftijd van de vrouw en ook van de man moeten bij de evaluatie betrokken worden.

De kans op het ontstaan van geslachtschromosomale afwijkingen bij de nakomelingen is afhankelijk van de volgende factoren. Bij azoöspermie komen vaker chromosomale afwijkingen bij de man voor (zie Hfdst.IV). Door zaadcellen veroorzaakte aneuploïde zwangerschappen komen minder vaak voor dan verwacht mag worden op basis van karyotypering van zaadcellen bij mannen met en zonder structurele afwijkingen (108,109,110,111). Onder normale omstandigheden selecteert de intacte eicel niet op geslachtschromosomale aneuploïdie gezien het spontane, relatief frequente voorkomen van XXY mannen. Een pre-zygotische selectie in de natuur zou derhalve discutabel zijn (112). ICSI maakt bevruchting en implan-

tatie mogelijk bij extreme oligozoöpermie ($<1.10^6$ spz/ml) die zonder ICSI niet zou optreden. Er worden echter niet meer dan 1,2% geslachtschromosomale afwijkingen bij de nakomelingen gevonden (113). Waarschijnlijk vindt er post-zygotische embryoselectie plaats. Munné et al.(114) troffen hetzelfde percentage numerieke chromosomale afwijkingen aan bij zygoten met 2 pronucleï na toepassing van IVF en ICSI. Alleen een grote toename van het percentage aneuploïde zaadcellen(of eicellen) zal zichtbaar zijn bij de nakomelingen.

Bijzondere aandacht verdient follow-up van de zwangerschappen met chirurgisch verkregen zaadcellen.

In de groep transport cryo-TESE werd bij 40% prenataal chromosomenonderzoek van de foetus gedaan, zonder afwijkingen te vinden, bij de Duitse patiëntengroep lag dit percentage nog lager (34%).

De follow-up resultaten van alle zwangerschappen na cryo-TESE en MESA zijn in tabel XXI samengevat. Bij 53 kinderen werd 1 aangeboren (1,7%) en 1 chromosomale afwijking (1,7%) gevonden. De follow-up studie van TESE/MESA patiënten uit de VU-Brussel (107) illustreert hoe moeilijk het is, gegevens van een populatie zwangeren te verkrijgen (Tabel XXI). Van alle zwangerschappen werd bij 33,6% van de foetus prenataal chromosomen onderzoek gedaan. Hoewel de verhoogde kans op geslachtschromosomale afwijkingen bij de ouders bekend was, werd om uiteenlopende redenen niet gekozen voor genetisch onderzoek. Meschede (115) bevestigt de geringe aanvaarding (17%) van prenataal chromosomaal onderzoek door ICSI-paren (n=107).

De voorlopige gegevens over de risico's voor nakomelingen na TESE uit Brussel en cryo-TESE uit Düsseldorf wijken niet duidelijk af van die uit de grote follow-up studie na ICSI (113) en zijn derhalve geruststellend.

Tabel XXI. Follow-up resultaten uit de VU-Brussel en IVF-Centrum Düsseldorf 1998

	<i>VU-Brussel (108)</i>		<i>Follow-up</i>	<i>IVF-Centrum Düsseldorf</i>	
	<i>MESA</i>	<i>TESE</i>		<i>TESE/MESA*</i>	<i>Follow-up</i>
Zwangerschap	73†	77†	94%	72*	97%
„ongoing”	?	?		13(18%)	
<i>Partus</i>	40(55%)*	34(44%)		40(56%)*	
1-ling	26(36%)	21(28%)		27(37%)	
2-ling	11(15%)	10(13%)		12(17%)	
3-ling	3(4,1%)	3(3,9%)		1(1,4%)	
AC of CVS	21	15	43%	21	36%
Chrom. abnormaal	-	-		1(1,9%)‡	
Congenitale afw.‘	2(3,6%)	1(2%)		1(1,9%)§	

AC: amniocentese

CVS: chorionic villus sampling

‡ hartafwijking t.g.v. tubereuze sclerose

§ 47,XY,+mar

† hCG positief

** foetale hartactie positief*

** percentage uitgaande van de biochemische zwangerschappen*

‡ percentage van de klinische zwangerschappen

‘ percentage van de kinderen

TESE/MESA groep samengevoegd vanwege het geringe aantal MESA patiënten.

Veiligheidsaspecten van ICSI met gebruikmaking van chirurgisch verkregen zaadcellen: overwegingen in samenhang met het Gezondheidsraadrapport over ICSI

De Gezondheidsraad (GR) beschouwde MESA/TESE, op grond van veiligheidsoverwegingen, als onverantwoord (90). Buiten Nederland werden deze technieken wel uitgevoerd.

Een aantal punten kan tot een heroverweging leiden.

- Het is zinvol een onderscheid aan te brengen tussen MESA/TESE kandidaten met obstructieve en niet-obstructieve azoöspermie. De kwaliteit van de zaadcellen zal bij een obstructieve stoornis, bijvoorbeeld na sterilisatie, geen aanleiding kunnen geven tot bedenkingen. De bevruchttings-/implantatiekansen van cryo-TESE bij obstructieve azoöspermie bevestigen dit.
- Het rapport geeft niet duidelijk aan wat onder het gebruik van onrijp of verouderd sperma wordt verstaan. In § 3.2.2. van het GR-rapport wordt onvolledig uitgerijpt sperma geassocieerd met technieken waarbij voorstadia van spermatozoa worden gebruikt. Onze cryo-TESE betreft uitsluitend ICSI met spermatozoa. De vermoede “onrijpheid” van testiculaire zaadcellen wordt gebaseerd op een artikel van Nagy et al.(45). Deze studie vergelijkt 965 ICSI cycli met 17 TESE cycli. Het significant lagere bevruchttingspercentage bij TESE in vergelijking met ICSI en werd door “onrijpheid” van de zaadcel verklaard. De oorzaak moet eerder gezocht worden in de volgende mogelijkheden: aanvankelijke onervarenheid met TESE (n=17), een ICSI-controlegroep met een hoge zaadcelconcentratie/ml (mediaan 18.10^6 /ml), het gebruik van immotiele zaadcellen (mogelijk avitaal) bij de TESE voor ICSI. Bovendien kan de oorzaak voor de infertiliteit van de man ook een verklaring vormen. Er zijn dus eigenlijk geen goede argumenten om “onrijpheid” te veronderstellen.
- Het GR-rapport spreekt verder over ICSI met testiculaire of epididymale spermatozoa, die op motiliteit en morfologie „geselecteerd” worden. Het selecteren op morfologie of veroudering van de zaadcel is tijdens de uitvoering van de ICSI technisch niet mogelijk. Bovendien is de morfologie niet gerelateerd met de chromosomale status van de zaadcel (116).
- Het criterium beweeglijkheid is niet absoluut daar onbeweeglijke testiculaire zaadcellen na een bepaalde tijd toch beweeglijk kunnen worden.

In het GR-rapport wordt een verhoogd genetisch risico verondersteld bij ICSI met niet-

geëjaculeerde zaadcellen. Dit onbekende genetische risico wordt toegeschreven aan een hypothetische verstoring of niet voltooid zijn van genomic imprinting en aan oxidatieve DNA-beschadiging.

- De rol van incomplete “genomic imprinting” bij MESA/TESE is moeilijk in te schatten omdat zowel de exacte betekenis, het mechanisme en tijdsverloop van genomic imprinting bij de gametogenese/ bevruchting bij de mens nog niet is opgehelderd. Bij IVF is “genomic imprinting” van eicellen nooit een punt van discussie geweest. Indirecte aanwijzingen voor genomic imprinting zijn gebaseerd op DNA-methylering van de gameten (117-120). Zelfs nog bij pre-implantatie- en vroege post-implantatie- muizenembryo's werden veranderingen van “genomic imprinting” waargenomen (121). Door onberekenbaarheid van effecten van genomic imprinting, dat niet volgens de wetten van Mendel verloopt, is extrapolering naar de mens moeilijk. Hall (120) benadrukt in een overzichtsartikel: “It is not clear whether imprinting is maintained throughout life, in all tissues, in all individuals of a particular strain, or from one species to another in homologous areas”.
- Yanagimachi toonde aan met muizenmodellen (55, 56) dat na injectie van spermatide-kernen in de eicel normale ontwikkeling en fertiliteit van nakomelingen ontstaat (123). Bovendien waren bij het gebruik van morfologisch abnormale zaadcellen de nakomelingen normaal vruchtbaar.
- Voorts is de extrapolatie van de resultaten uit dier-experimenteel onderzoek naar de mens moeilijk.

Het GR-rapport vermeldt een verhoogde kans op DNA-schade bij verouderde zaadcellen (124,125). Dit risico zou groter zijn bij obstructie, echter eveneens bij verminderde spermatogenese en bij oudere mannen.

- Aitken (126) heeft op het ontstaan van DNA-schade door O₂-radicalen in IVF-medium t.g.v. centrifugeren gewezen. Verder toonde hij aan dat zaadcellen met DNA-breuken bij de hamster-test een pronucleus konden vormen (127). Centrifugeren van zaadcellen is echter al jaren routine bij gewone IVF en IUI.

De conclusie is dat er op basis van nu beschikbare dierexperimentele- en klinische onderzoeken genoeg argumenten zijn uit om ICSI met chirurgisch verkregen zaad toe te laten. Ter evaluatie van risico's voor nakomelingen is een follow-up studie geïndiceerd.

Voorafgaande aan de behandeling moet preconceptioneel counselling plaatsvinden.

Deze follow-up kan verder bestaan uit:

1. preconceptioneel chromosomaal onderzoek van het paar, op indicatie DNA-analyse op mutaties van het Y-chromosoom en CF,
2. prenataal of postnataal chromosomaal onderzoek van de nakomelingen,
3. DNA-mutatie analyse van het Y-chromosoom in het navelstrengbloed,
4. gestandariseerde (blinde) controles door kinderartsen in daarvoor uitgezochte centra.

Vanwege mogelijk ICSI-gerelateerde ontwikkelingsstoornissen (128) bij kinderen, dient de follow-up zolang voortgezet te worden totdat, met inachtnaam van buitenlandse projecten, voldoende zekerheid bestaat over de risico's voor nakomelingen na ICSI met chirurgisch verkregen zaad.

Referenties

1. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985;2:119-22.
2. Silber SJ. Pregnancy caused by sperm from vasa efferentia. *Fertil Steril* 1988;49:373-5.
3. Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C, Ord T, Asch R. Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1988 ;50:525-8.
4. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994;9:1705-9.
5. Moore HD, Curry MR, Penfold LM, Pryor JP. The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. *Fertil Steril* 1992;58:776-83.
6. Steinberger E, Tjioe DY. A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. *Fertil Steril* 1968;19:959-61.
7. Silber SJ, Rodriguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril* 1981;36:480-5.
8. Jow WW, Steckel J, Schlegel PN, Magid MS, Goldstein M. Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl* 1993;14:194-8.
9. Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 1997;12:2422-8.
10. Friedrich KJ, Prieur H, Montag M, van der Ven H, Haidl G. Prognostischer Wert von Hoden histologien bezüglich der Ergebnisse bei TESE. *Fertilität* 1997;13:155-7.
11. Silber SJ. Perfect anatomical reconstruction of vas deferens with a new microscopic surgical technique. *Fertil Steril* 1977;28:72-7.
12. Silber SJ. Vasectomy and vasectomy reversal. *Fertil Steril* 1978; 29: 125-40.
13. Silber SJ. Microscopic vasoepididymostomy: specific microanastomosis to the epididymal tubule. *Fertil Steril* 1978; 30: 565-71.
14. Lacham-Kaplan O, Trounson AO. Embryo development capacity of oocytes fertilized by

- immature sperm and sperm treated with motility stimulants. *Reprod Fertil Dev* 1994;6:113-6.
15. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
 16. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1994;9:2058-61.
 17. Cha KY, Oum KB, Kim HJ. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997;67:985-95.
 18. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:1237.
 19. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman-Deboeck. A Pregnancy obtained with human testicular spermatozoa in an in vitro fertilization program. *J Androl* 1994;15 Suppl:10S-13S.
 20. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994;62:639-41.
 21. Craft I, Tsirigotis M, Bennett V, Taranissi M, Khalifa Y, Hogewind G, Nicholson N. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1995;63:1038-42.
 22. Huhner M. Aspiration of the testicles in the diagnosis and prognosis of sterility. *J Urol* 1928;19:31-41.
 23. Nseyo UO, Englander LS, Huben RP, Pontes JE. Aspiration biopsy of the testis: another method for histologic examination. *Fertil Steril* 1984;42:281-4.
 24. Foresta C, Varotto A, Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil Steril* 1992;57:858-65.
 25. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Human Reprod* 1997;12:1488-93.
 26. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9.

27. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smits J, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995;10:2630-6.
28. Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W. A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum Reprod* 1996;11:752-5.
29. Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A. The use of enzymatic procedures to recover testicular germ cells. *Hum Reprod* 1997;12:1682-7.
30. Aslam I, Robins A, Dowell K, Fishel S. Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13:639-45.
31. Shepherd WR, Millette FC, DeWolf CW. Enrichment of primary pachytene spermatocytes from the human testes. *Gamete Res* 1981;4:487-98.
32. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC. An improved treatment procedure for testicular biopsy specimens offers more efficient sperm recovery: case series. *Fertil Steril* 1997;68:376-9.
33. Tsirigotis M, Bennett V, Hogewind G, Pelekanos M, Craft I. Percutaneous epididymal sperm aspiration simplified sperm recovery for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1994;9:169-70.
34. Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995;10:1623-6.
35. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997;12:1688-92.
36. Harrington TG, Schauer D, Gilbert BR. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J Urol* 1996;156:1647-51.
37. Tsirigotis M, Craft I. Sperm retrieval methods and ICSI for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10:758-60.
38. Novero V Jr, Goossens A, Tournaye H, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Seminoma discovered in two males undergoing successful testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996;65:1051-4.
39. Lenz S, Giwercman A, Skakkebaek NE, Bruun E, Frimodt Moller C. Ultrasound in detection of early neoplasia of the testis. *Int J Androl* 1987;10:187-90.

40. Giwercman A, Berthelsen JG, Muller J, von der Maase H, Skakkebaek NE. Screening for carcinoma-in-situ of the testis. *Int J Androl* 1987;10:173-80.
41. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Muller J. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am* 1982;9:377-85.
42. Hovatta O, Moilanen J, von Smitten K, Reima I. Testicular needle biopsy, open biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10:2595-9.
43. Abuzeid MI, Sasy MA, Salem H. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a simplified method for treatment of obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1997;68:328-33.
44. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA, Amin YM. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril* 1997;68:108-11.
45. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995;63:808-15.
46. Hendry WF. Azoospermia and surgery for testicular obstruction. In Hargreave, TB (ed), *Male Infertility* 1994 Springer Verlag, London, pp.337-63.
47. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J Clin Res Ed* 1985;291:1693-7.
48. Pryor JP, Hendry WF. Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients. *Fertil Steril* 1991;56:725-30.
49. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992;267:1794-7.
50. Dubin L, Amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 1971;22:469-74.
51. Sofikitis NV, Miyagawa I, Agapitos E, Pasyianos P, Toda T, Hellstrom WJ, Kawamura H. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J Assist Reprod Genet* 1994;11:335-41.
52. Sofikitis NV, Toda T, Miyagawa I, Zavos PM, Pasyianos P, Mastelou E. Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development. *Fertil Steril* 1996;65:176-85.

53. Ogura A, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 1993;48:219-25.
54. Ogura A, Yanagimachi R, Usui N. Behaviour of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote* 1993; 1:1-8.
55. Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7460-2.
56. Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995;121:2397-405.
57. Edwards RG, Tarin JJ, Dean N, Hirsch A, Tan SL. Are spermatid injections into human oocytes now mandatory? *Hum Reprod* 1994;9:2217-9.
58. Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995;333:525.
59. Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 1996;11:772-9.
60. Tesarik J, Rolet F, Bami C, Sedbon E, Thorel J, Tibi C, Thebault A. Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996;11:780-3.
61. Vanderzwalmen P, Lejeune B, Nijs M, Segal Bertin G, Vandamme B, Schoysman R. Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1995;10:502-3.
62. Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, al Hassan S. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* 1995;345:1641-2.
63. Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996;66:110-7.
64. Silber SJ, Johnson L. Are spermatid injections of any clinical value? *Hum Reprod* 1998;13:509-23.
65. Verheyen G, Crabbé E, Joris H, Van Steirteghem A. Simple and reliable identification of the human round spermatid by inverted phase-contrast microscopy. *Hum Reprod* 1998;13:1570-7.
66. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M, Van Steirteghem A. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 1996;11:1644-9.

67. Schlegel PN, Berkeley AS, Goldstein M, Cohen J, Alikani M, Adler A, Gilbert BR, Rosenwaks Z. Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micro-manipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1994;61:895-901.
68. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994;61:1045-51.
69. Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995;10:2031-43.
70. Silber SJ, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Fertilizing capacity of epididymal and testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995;7:281-92.
71. Hamberger L, Sjogren A, Lundin K, Soderlund B, Nilsson L, Bergh C, Wennerholm UB, Wikland M, Svalander P, Jakobsson AH, et al. Microfertilization techniques--the Swedish experience. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:263-7.
72. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Fahmi I, Ramzy AM, Amin Y. Intracytoplasmic sperm injection using microsurgically retrieved epididymal and testicular sperm. *Fertil Steril* 1996;65:566-72.
73. Craft IL, Khalifa Y, Boulos A, Pelekanos M, Foster C, Tsirigotis M. Factors influencing the outcome of in-vitro fertilization with percutaneous aspirated epididymal spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum Reprod* 1995;10:1791-4.
74. Tsirigotis M, Pelekanos M, Beski S, Gregorakis S, Foster C, Craft IL. Cumulative experience of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) with intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:315-9.
75. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
76. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal Bertin G, van Roosendaal E, Schoysman Deboeck A. Pregnancy obtained with human testicular spermatozoa in an in vitro fertilization program. *J Androl* 1994;15, Suppl:10s-13s.

77. Silber SJ, Devroey P, Nagy Z, Tournaye H, Van Steirteghem A. Micro-epididymal sperm aspiration with epididymal versus testicular biopsy spermatozoa. *Hum Reprod* 1994;9,Suppl 4:49.
78. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Silber S. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10:1457-60.
79. Bourne H, Richings N, Harari O, Watkins W, Speirs AL, Johnston WI, Baker HW. The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:237-45.
80. Tucker MJ, Morton PC, Witt MA, Wright G. Intracytoplasmic injection of testicular and epididymal spermatozoa for treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10:486-9.
81. Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:115-9.
82. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995;10:148-52.
83. Gil Salom M, Minguez Y, Rubio C, De los Santos MJ, Remohi J, Pellicer A. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995;10:3166-70.
84. Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996;11:127-32.
85. Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Aksoy S, Tasdemir M, Nuhoglu A, Tasdemir I, Balaban B, Biberoglu K, Schoysman R, Nijs M, Vanderzwalmen P. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1996;11:756-60.
86. Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 1997;20,Supp 3:69-73.
87. Dohle GR, Ramos L, Pieters MHEC, Braat DDM, Weber RFA. Surgical sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection as treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998;3:620-23.

88. Bourne H, Watkins W, Speirs A, Baker HW. Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needle biopsy of the testis. *Fertil Steril* 1995; 64: 433-6.
89. Allan JA, Cotman AS. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. *Fertil Steril* 1997;68:741-4.
90. Gezondheidsraad: Commissie Herziening Planningsbesluit IVF. ICSI. Den Haag: Gezondheidsraad, 1996;publikatie nr 1996/6.
91. In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.
92. Chemes H, Cigorrage S, Bergada C, Schteingart H, Rey R, Pellizzari E. Isolation of human Leydig cell mesenchymal precursors from patients with the androgen insensitivity syndrome: testosterone production and response to human chorionic gonadotropin stimulation in culture. *Biol Reprod* 1992;46:793-801.
93. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12:734-9.
94. Romero J, Remohi J, Minguez Y, Rubio C, Pellicer A, Gil Salom M. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 1996;65:877-9.
95. Fischer R, Baukloh V, Naether OG, Schulze W, Salzbrunn A, Benson DM. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Hum Reprod* 1996;11:2197-9.
96. Holstein AF, Wulffhekel U. Die Semidünnschnitt-Technik als Grundlage für eine cytologische Beurteilung der Spermatogenese des Menschen. *Andrologia* 1971;3:65-9.
97. Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates RD. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 1997;49:91-5.
98. Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod* 1998;13:1230-4.
99. Novero V, Camus M, Tournaye H, Smits J, Verheyen G, Joris H, Derde M, Van Steirteghem AC, Devroey P. Relationship between serum follicle stimulating hormone in

- the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:59-63.
100. Gilbaugh JH, Patil VR, Turek PJ, Lipschultz LI. Testis biopsy findings in azoospermic patients with markedly elevated serum FSH levels. Presented at the 50th annual meeting of the American Fertility Society. San Antonio, 5-10 November 1994, p S63.
 101. Martin du PAN RC, Bischof P. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod* 1995;10:1940-5.
 102. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection. Microsurgical or percutaneous epididymal sperm aspiration, excisional biopsy or aspiration of the testis which method is to be preferred? *Hum Reprod* 1998; Suppl in press.
 103. De Croo, I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:1893-7.
 104. Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, van Roosendaal E, Schoysman R. Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:2180-5.
 105. Nagy ZP, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:890-5.
 106. Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:2429-33.
 107. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A, Libaers I. A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 1:196-207.
 108. Brandriff B, Gordon L, Ashworth LK, Littman V, Watchmaker G, Carrano AV. Cytogenetics of human sperm: meiotic segregation in two translocation carriers. *Am J Hum Genet* 1986;38:197-208.
 109. Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K, Long Simpson L, Peterson D, Yamamoto J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 1987;77:108-14.

110. Martin RH. Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 1988;80:357-61.
111. Martin RH. Meiotic segregation of human sperm chromosomes in translocation heterozygotes: report of a t(9;10)(q34;q11) and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet* 1988;47:48-51.
112. Meschede D, De Geyter C, Nieschlag E, Horst J. Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995;10:2880-6.
113. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1996;11 Suppl 4:131-55.
114. Munné S, Márquez C, Reing A, Garrisi J, Alikani M. Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:904-8.
115. Meschede D, Lemcke B, Strßel J, Louwen F, Horst J. Strong preference for non-invasive prenatal diagnosis in women pregnant through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Prenat Diagn* 1998;18:700-5.
116. Martin R, Rademaker A. The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mut Res* 1988;207:159-164.
117. Trasler JM, Alcivar AA, Hake LE, Bestor T, Hecht NB. DNA methyltransferase is developmentally expressed in replicating and non-replicating male germ cells. *Nucleic Acids Res* 1992;20:2541-5.
118. del Mazo J, Prantero G, Torres M, Ferraro M. DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chromosome Res* 1994;2:147-52.
119. Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* 1994;7:59-63.
120. Jue K, Bestor TH, Trasler JM. Regulated synthesis and localization of DNA methyltransferase during spermatogenesis. *Biol Reprod* 1995;53:561-9.
121. Hall JG. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 1990;46:857-73.
122. Mann M, Latham KE, Varmuza S. Identification of genes showing altered expression in preimplantation and early postimplantation parthenogenetic embryos. *Dev Genet* 1995;17:223-32.

123. Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 1:87-98.
124. Cummins JM, Jequier AM. Concerns and recommendations for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:138-43.
125. Cummins JM, Jequier AM. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Hum Reprod* 1994;9:1214-9.
126. Twigg J, Stewart Irvine D, Houston O, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4:439-45.
127. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxydative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:1864-71.
128. Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998;351:1529-34.

Samenvatting

Dit proefschrift is een beschouwing over implantatiekansen van embryo's bij toepassing van in-vitro fertilisatie.

Achtereenvolgens worden besproken:

- De implantatiekansen van intratubair geplaatste zygoten,
- De implantatiekansen na een verlengde kweekduur,
- De implantatiekansen van embryo's afkomstig van paren met een chromosoomafwijking,
- de implantatiekansen van embryo's ontstaan na gebruik van chirurgisch verkregen zaadcellen.

De historische achtergrond van de ontwikkeling van de humane klinische voortplantingsgeneeskunde wordt besproken. Experimenten betreffende het tijdstip en ontwikkelingsstadium van embryo's bij het plaatsen in tuba of uterus worden genoemd. Tevens wordt een synopsis gegeven over de technische ontwikkelingen van in-vitro-fertilisatie sinds de geboorte van het eerste IVF-kind in 1978.

Een literatuuroverzicht en analyse van laparoscopische en transvaginale plaatsing van gameten en embryo's in de tuba wordt gepresenteerd.

Naar aanleiding van de goede resultaten van GIFT en ZIFT werd een project gestart om via de cervix de tuba te catheteriseren en zygoten in de tuba te plaatsen. Van 25 patiënten werden in een pilotstudie 8 zwanger. Daaropvolgend werd een gerandomiseerd project in het AZ Dijkzigt gestart om de validiteit van de Transcervicale Intra-Fallopian Transfer (TIFT) te toetsen. Het resultaat was dat TIFT (n=57) een significant slechtere implantatie (4% per zygote) had vergeleken met IVF-ET (n=49, 12% per 4-8 cellig embryo). Het gebruikte cathetersysteem liet geen betrouwbare blinde plaatsing van zygoten in de tuba toe. Wezenlijke technische verbeteringen zijn nog niet tot stand gekomen.

De implantatiekansen van embryo's na verlenging van de embryokweek werd onderzocht. Aspecten van de preïmplantatie-ontwikkeling tot blastocyste en kweekomstandigheden werden samengevat. Dierexperimenteel onderzoek vóór het IVF-tijdperk en een eerder project in

het AZ-Rotterdam hadden getoond dat optimale synchronisatie tussen embryo en endometrium bij uteriene plaatsing van blastocysten in een goede implantatiekans resulteerden.

Een vervolgpriject werd geïnitieerd in het IVF-Centrum Düsseldorf. Een prospectief gerandomiseerde studie vergeleek plaatsing van 8-cellige embryo's op dag 3 en blastocysten op dag 5 na de eicelpunctie. Een verwachte hogere implantatiekans (35%) van blastocysten kon bevestigd worden evenals een significant slechtere implantatiekans ($p < 0,001$) van minder ontwikkelde stadia op dag 5. Het gemiddelde percentage zwangerschap per ET van plaatsing op dag 3 (26%) en 5 (25%) verschilt niet, waaruit de conclusie getrokken kan worden dat een verlengde kweekduur geen negatieve effecten veroorzaakt.

Het aantal gepuncteerde eicellen bepaalt de kans op plaatsing van minimaal 1 blastocyste. De leeftijd van de IVF-patiënte beïnvloedt deze kans minder sterk. De gemiddelde implantatiekans van een blastocyste bleek in cyclus 1 en 2 vrijwel gelijk (23%) en nam in cyclus 3 en 4 duidelijk (12-13%) af. Bij paren waarbij in cyclus 1 geen blastocyste in de kweek was, is de kans daarop in de daaropvolgende cyclus lager dan bij paren die in de eerste cyclus wél een blastocyste ter beschikking hadden.

Zonder blastocystevorming bestaat een laag implantatiepercentage (6%-2%) en is geen verschil in implantatiekans tussen cyclus 1-4 vast te stellen.

Een kort overzicht wordt gegeven van geslachtsdeterminatie en differentiatie, genetische aspecten van infertiliteit en oorzaken van infertiliteit bij de man. Populatiestudies over chromosomale afwijkingen bij IVF en ICSI patiënten worden besproken en vergeleken met een eigen studie van ICSI-patiënten ($n=2280$).

In het IVF-Centrum Düsseldorf werd systematisch chromosomaal onderzoek bij man ($n=1116$) en vrouw ($n=1164$) vóór aanvang van de ICSI-behandeling uitgevoerd. Het percentage afwijkingen van de geslachtschromosomen was 1,52 en van de autosomen 2,23 bij de man, respectievelijk 7,47 en 1,29 bij de vrouw. De betekenis van de laagfrequente geslachtschromosomale mozaïeken bij de vrouw wordt besproken.

De implantatiekansen van embryo's die afkomstig zijn van probandi met een geslachtschromosomale of autosomale afwijking blijken niet statistisch significant te verschillen.

Geconcludeerd wordt dat voor een uitspraak over de klinische betekenis van een geslachtschromosomale of autosomale afwijking bij probandi in een ICSI-patiëntengroep het onderzoeksmateriaal nog verder uitgebreid dient te worden. Aanbevolen wordt ICSI-paren chromosomaal te onderzoeken.

Tenslotte wordt een inventarisatie van de toepassing van ICSI met chirurgisch verkregen zaadcellen gegeven. Er wordt een beschrijving gegeven van technieken. Een overzicht van vergelijkbare studies betreffende MESA, PESA, TESE en TESA wordt gepresenteerd.

Een aanpassing op de TESE techniek wordt beschreven, waarbij testismateriaal vooraf gecryopreserveerd wordt. Na ontdooiing worden zaadcellen uit dit weefsel geïsoleerd d.m.v. mechanische en enzymatische bewerking. In het IVF-Centrum Düsseldorf werden twee patiëntengroepen, één na testisweefsel- en eiceltransport, de andere uit eigen regionaal patiëntmateriaal onderzocht. Vergelijking met literatuurgegevens toont dat de implantatiekans (18-19%, bij obstructieve azoöspermie) in dezelfde orde van grootte ligt als bij TESE met vers testismateriaal en dat transport daaraan geen afbreuk doet. Bij gebruik van onbewegelijke zaadcellen is de implantatiekans van embryo's significant lager, serum-FSH beïnvloedt deze kans niet. Er werden 52 kinderen na cryo-TESE geboren, 1 congenitale afwijking en 1 chromosoomafwijking werd gevonden.

Er wordt vastgesteld dat er momenteel geen overtuigende argumenten bestaan om de vermoedens betreffende genetische risico's van TESE te bevestigen. Het gebruik van chirurgisch verkregen zaadcellen voor ICSI kan worden toegestaan. Ter evaluatie van de resultaten zal tevens een follow-up studie moeten starten.

Summary

This thesis describes implantation chances of embryos in in-vitro-fertilization.

Discussed are:

- Implantation chances with intratubal transfer of zygotes,
- Implantation chances after prolonged embryo culture,
- Implantation chances of embryos from patients with a chromosomal aberration,
- Implantation chances of embryos obtained with surgically retrieved sperm.

The historical background and pertaining animal experiments are reviewed.

Technical development of ART after the birth of the first IVF-baby in 1978 is discussed.

A review of literature and analysis of laparoscopic and transvaginal transfer techniques is presented.

In a pilot study according to the transfer of zygotes by transvaginal intrafallopian transfer, TIFT, (n=25) 8 pregnancies occurred. In a subsequent randomized study IVF-ET(n=49) with 4-8 cell embryos, IVF-ET had a significantly higher implantation rate than TIFT (n=57), respectively 12% and 4%. Blind cannulation of the tubes appeared to be unreliable. Clinical use of TIFT was abandoned.

Implantation chances after prolonged embryo culture were studied.

After an introduction to preimplantation development and culture techniques our clinical studies are reported. A former project at the Academical Hospital Rotterdam showed no deleterious effects of prolongation of embryo culture. A prospective randomized study of ET after 3 and 5 days subsequently confirmed the high implantation rate of blastocysts(35%) and the possibility to obtain a normal pregnancy rate even after reduction of the number of embryos transferred. The average pregnancy rates per ET on day 3 (26%) and 5 (25%) did not differ significantly, which means that in our system prolongation of embryo culture is not deleterious.

Primarily the number of oocytes retrieved determines the chance to attain at blastocyst transfer. Nevertheless the age of the woman also proved to be a significant factor. The implantation chance of a blastocyst in successive IVF cycles was significantly lower after the 2nd cycle

(cycle 1-2: 23%, cycle 3-4:12-13%). Patients having a blastocyst transfer in cycle 1, have significantly higher chances to achieve a blastocyst transfer in a subsequent cycle. There are no significant differences in implantation chances in cycle 1-4 for couples without blastulation (6-2%).

A short introduction to sex determination and differentiation, genetical causes of male infertility is given. Cytogenetic analysis of a group of ICSI patients (n=2280) is compared with studies of IVF/ICSI patients published elsewhere. The percentages of cytogenetic aberration of the sex chromosomes was 1,52, of the autosomes 2,23 in the male (n=1116), respectively 7,47 and 2,3 in the female probands (n=1164). The increased rate of sex chromosome aberration in the female is discussed.

A comparison of implantation rates of embryos derived from couples with a sex chromosomal or autosomal aberration did not show a significant lower implantation rate. Extension of the study material is necessary. Genetic counselling of ICSI couples is recommended.

The last part of this thesis is an inventarisation of ART with surgically retrieved sperm. Studies on MESA, PESA, TESE and TESA are reviewed.

A modification of TESE is described, in which prior to the ICSI cycle, a testis biopsy is performed and cryopreserved. Isolation of spermatozoa is performed with a combination of mechanical and enzymatical work-up. Two groups of patients are studied consisting of a group with transport of testicular material and subsequent oocyte transport and a group of regional patients without transport. Compared with the literature no deleterious effects are observed after transport of material nor after cryopreservation (implantation rate in obstructive azoospermia 18-19%). After cryo-TESE 52 children have been born, 1 congenital malformation and 1 chromosomal aberration have been found.

Finally possible genetic risks of TESE are discussed.

After analysis of literature and follow-up results there are no convincing arguments that more uncertain risks are involved in ICSI with surgically retrieved compared to ICSI with ejaculated sperm. In conjunction with a follow-up study ICSI with surgically retrieved sperm should be legalized in the Netherlands.

Verklarende Woordenlijst

AMH:	Anti-Müllerian hormoon
ASRM:	American Society of Reproductive Medicine
AZF:	Azoöspermie Factor
BSE:	Bovine Spongiform Encephalopathie
CBVDA:	Congenitale Bilaterale Vas Deferens Agenesie
CF:	Cystische Fibrose
CIS:	Carcinoma In Situ
CSF-1:	Colony Stimulating Factor-1
CVS:	Chorionic Villus Sampling
CYP:	Cytochrome P groep
DAX1:	DSS-AHC Region on Human X Chromosome, Gene1
DAZ:	Deleted in AZoospermia
DHT:	DiHydroTestosteron
DIPI:	DIrect Intra Peritoneal Insemination
DSS:	Dosage Sensitive Sex reversal gen
EDTA:	EthyleneDiamineTetracetic Acid
EGF:	Epidermal Growth Factor
ESHRE:	European Society of Human Reproduction and Endocrinology
ET:	Embryo Transfer (= Embryoplaatsing)
FISH:	Fluorescentie In Situ Hybridisatie,
FSH:	Follikel Stimulerend Hormoon
FSP:	Fallopian Sperm Perfusion
GIFT:	Gamete Intra-Fallopian Transfer
GnRH-ana:	Gonadotroop Releasing Hormoon Analoom
GPO:	Gepasteuriseerde Plasmaeiwit Oplossing
GR:	GezondheidsRaad
HbsAg:	Hepatitis b Surface Antigeen
HCG:	Humaan Chorio-Gonadotrofine
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HMG:	Humaan Menopausaal Gonadotrofine
HSD:	Hydroxy-Steroid Dehydrogenase

ICSI:	Intra-Cytoplasmatische Sperma Injectie
IGF:	Insuline-like Growth Factor
IVF:	In-Vitro-Fertilisatie
IUI:	Intra-Uteriene Inseminatie
LH:	Luteïniserend Hormoon
MESA:	Micro Epididymale Sperma Aspiratie
MIF:	Müllerian Inhibiting Factor
PDGF-A:	Platelet, Derived Growth Factor A
PESA:	Percutane Epididymale Spermatozoa Aspiratie
PN:	ProNucleus
PROST:	Pronuclear Stage Transfer
PVP:	PolyVinylPyrrolidone
rec-FSH:	Recombinant Follikel Stimulerend Hormoon
ROSI:	ROnde Spermatide Injectie
ROSNI:	ROnde Spermatide Nucleus Injectie
SF1:	Steroidogenic factor 1
SOX9:	SRY-related high mobility group box 9
SRD5A2:	Steroid 5 α Reductase 2 Deficiëntie
SRVX:	X-linked Sex Reversing factor
SRY:	Sex determining Region Y (= TDF: Testis Determining Factor)
StAR:	Steroidogenic Acute Regulatory gen
SUZI	Sub Zonal sperm Injection
TDA:	Testis Determing Autosomal trait
TEFNA:	Testiculaire "Fine Needle Aspiration",
TESA:	Testiculaire Sperma Aspiratie
TESE:	Testiculaire Sperma Extractie
TET:	Tubal Embryo Transfer
TFF:	Total Fertilization Failure
TGF:	Transforming Growth Factor
TIFT:	Transcervical IntraFallopian Transfer
TOAST:	Transcervical Oocyte And Sperm Transfer
XH2:	X-linked Helicase 2
YRRM:	Y chromosome RNA Recognition Motif
ZIFT:	Zygote Intra Fallopian Transfer

Dankwoord

Aan dit proefschrift liggen ervaringen ten grondslag uit de dagelijkse klinische voortplantingsgeneeskunde.

In chronologische volgorde wil ik die mensen bedanken, die dit mogelijk hebben gemaakt.

De actieve steun en inzet van Einar van Roon, nu gynaecoloog te Oldenzaal, was belangrijk. Tijdens onze gemeenschappelijke opleidingstijd bij Dr. J.E.M. Evers leerde ik van hem de kneepjes van het echoscopisch onderzoek.

Een stage in het IVF laboratorium van Roel van Kooij in Locarno betekende een definitieve wending. Mijn interesse in de behandeling van kinderloosheid kreeg hierdoor een extra impuls. Het gevolg daarvan was mijn eerste persoonlijke contact met mijn promotor, Gerard Zeilmaker. Gedurende 15 jaar intensieve samenwerking werd de basis gelegd voor een van de grootste IVF laboratoria in Duitsland. Zijn grote ervaring bij de kwaliteitsbewaking is een doorslaggevende factor voor het succes daarvan geweest. Ik heb Gerard professioneel en privé goed leren kennen en waarderen. Zijn nuchtere, kritische blik heeft mij enorm ondersteund bij het vervullen van mijn idealen.

Mijn co-promotor, Ari Verhoeff, was direct bereid deel te nemen aan onze TIFT studie en heeft mij ook nadien met raad en daad bijgestaan.

Een speciaal woord van dank gaat uit naar Brigitte Roozenburg, met wie ik zowel in Nederland als in Duitsland intensief samengewerkt en veel ervaring opgedaan heb. De gesprekken en vele puncties vlogen voorbij in een opgeruimde “no-nonsense” sfeer, die ook andere collega's hebben leren waarderen.

De gecompliceerdheid van de statistiek bij opzet en analyse van projecten werd mij door Wim Hop duidelijk gemaakt. Statistiek werd daarom alleen door professionals uitgevoerd.

Ook de Nederlandse IVF-centra, gynaecologen en urologen wil ik mijn waardering uiten voor voor de prettige samenwerking, waardoor behandeling van Nederlandse patiënten mogelijk bleef.

Speciaal bedanken wil ik de leden van de leescommissie voor de adviezen, die een wezenlijke bijdrage vormden voor de uiteindelijke vorm van het manuscript.

De medewerkers van ons IVF- en cytogenetisch laboratorium ben ik integraal erkentelijk voor het presteren onder grote werkdruk en het voortdurend nastreven van kwaliteit.

De bereidheid van Paula Vogelaar en van Leen Doornhein om voldoende tijd te vinden voor de definitieve vormgeving van dit boekje was hartverwarmend.

Annette, zoals alles wat we samen ondernemen is dit tot een goed einde gebracht, jij weet hoe belangrijk je steun was. De kinderen hebben me telkens weer laten realiseren dat het werk dat ik doe, de behandeling van kindermisstanden, een goed doel is.

Curriculum Vitae

- 1951 Geboren te 's Gravenhage
- 1970 Eindexamen Gymnasium fl, St. Janscollege, 's Gravenhage
- 1977 Artsexamen Universiteit Leiden
- 1977-1978 Arts-assistent Gynaecologie, Bronovo Ziekenhuis, 's Gravenhage
- 1979-1982 Arts-assistent Intensive Care, Leyenburg Ziekenhuis, 's Gravenhage
A- opleiding gynaecologie, (dr. J.E.M Evers) Leyenburg Ziekenhuis,
's Gravenhage
- 1982-1983 B- opleiding gynaecologie, (dr. J. Versteeg) St. Clara Ziekenhuis, Rotterdam
- 1984-1985 Gynaecoloog, Refaja Ziekenhuis Dordrecht
Acrosomonderzoek Erasmus Universiteit, Prof.dr. G.H. Zeilmaker, Rotterdam
- 1985 Gynaecoloog, Akademisches Lehrkrankenhaus Grevenbroich
- 1986-1989 Gynaecoloog, IVF-team, afdeling Gynaecologie en Obstetrie, AZ Dijkzigt,
Rotterdam
- 1990 Gynaecoloog IVF-Zentrum Nordrhein, Essen
Fachkunde Strahlenschutz nach der Röntgenverordnung
- 1991 Gynaecoloog, Medifert, Nijmegen
- 1991-heden Gynaecoloog, IVF-Zentrum Düsseldorf
- 1996 Opleidingsbevoegdheid "Gynekologische Endokrinologie und
Reproduktionsmedizin" BRD.

